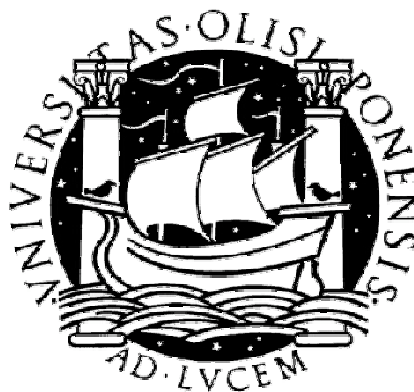


Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal

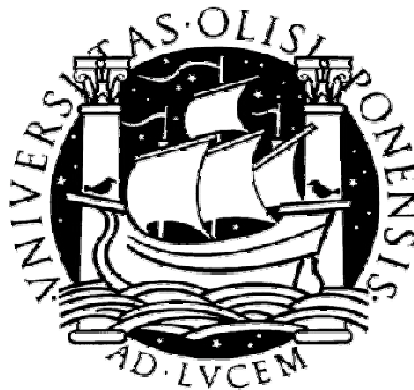


**Identificação e genotipagem
de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*
em amostras clínicas**

Miriam Ingride Mourisca Maia da Silva

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



**Identificação e genotipagem
de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*
em amostras clínicas**

Miriam Ingride Mourisca Maia da Silva

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada pela Prof. Doutora Filomena Martins Pereira (Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Unidade de Doenças Sexualmente Transmitidas, Rua da Junqueira 96, 1349-008 Lisboa, Portugal) e pela Prof. Doutora Lélia Mariana Marcão Chambel (Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, Campus da FCUL, 1749-016 Lisboa, Portugal).

2009

AGRADECIMENTOS

Agradece-se ao Professor Doutor Melo Cristino e ao Dr. Carlos Ribeiro do Laboratório de Bacteriologia, ao Dr. João Costa da Consulta de Dermatologia e Venerologia do Hospital de Santa Maria, à Dra. Manuela Vestia e ao Dr. Flávio Carvalho da Secção de Bioquímica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Distrital de Santarém, pelo protocolo estabelecido para a cedência de amostras clínicas para análise e pela disponibilização de informações relevantes que serviram de suporte para a elaboração desta tese.

À Dra. Ingride Alvaredo, à Inês Oliveira e à Dra. Helena Fidalgo do Centro de Acolhimento e Orientação à Mulher Irmãs Oblatas (CAOMIO), pela colaboração num projecto de rastreio de IST's e consequente recolha de amostras clínicas para estudo.

À Professora Doutora Lélia Chambel que aceitou ser minha orientadora interna de mestrado, toda a colaboração incansável nos aspectos técnicos e científicos que estruturaram esta tese e pelas críticas construtivas que permitiram melhorar a elaboração deste projecto. Ao Professor Doutor Rogério Tenreiro, Coordenador do Mestrado em Microbiologia Aplicada, o apoio e esclarecimento dos assuntos burocráticos inerentes a este projecto curricular. À aluna de Doutoramento Daniela Pinto pela ajuda e conselhos dados para a realização de algumas técnicas moleculares.

À Professora Doutora Filomena Martins Pereira, que aceitou ser minha orientadora externa de mestrado, a preciosa ajuda e conselhos para a orientação das linhas condutoras que regeram a presente tese, a sua disponibilidade e incentivo ao longo deste projecto científico e ainda a maneira calorosa como me recebeu e integrou na Unidade das DST's. À Professora Doutora Rita Castro e à Dra. Emília Prieto pelo apoio incondicional, pela paciência e tempo dispendido nos ensinamentos teóricos e laboratoriais ao longo do desenvolvimento deste estudo. À Professora Doutora Luzia Gonçalves pela cedência de bibliografia especializada da área da bioestatística e à Dra. Ana Subtil pela disponibilidade e pela ajuda preciosa na análise e tratamento estatístico dos resultados. A todos os professores, técnicos auxiliares e amigos das Unidades de Virologia e das Micobactérias que tão bem me acolheram e integraram.

Aos meus amigos, que peço desculpa não nomear devido ao número, mas eles sabem quem são, pela amizade que tiveram para comigo e pela compreensão demonstrada pela minha falta de tempo para eles.

Aos meus pais, Luís e Isabel, à minha irmã Cheila, à minha avó Lisete e ao meu primo Mauro por todo amor, carinho, apoio e orgulho demonstrados que tanto incentivo e alento me deram para a escrita desta tese.

Ao Paulo pela dedicação, paciência, empenho e sentido de humor que tantas vezes me deram forças ao longo deste projecto.

RESUMO

O agente etiológico da sífilis, *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, é uma bactéria helicoidal de forma espiralada, com movimento característico em forma de “saca-rolhas” e tem como único hospedeiro natural o Homem causando uma infecção sexualmente transmitida. O seu diagnóstico baseia-se, essencialmente, na associação dos sinais e sintomas clínicos com testes serológicos, uma vez que não é possível cultivar este microrganismo. O diagnóstico com base em técnicas de PCR tem sido descrito mas com sensibilidade e especificidade, nas fases assintomáticas da doença, pouco elevadas. Assim, os objectivos deste estudo foram comparar o diagnóstico obtido por quatro testes serológicos e otimizar e aplicar a várias amostras clínicas, colhidas de indivíduos com suspeita de terem sífilis, uma técnica de PCR diagnóstica (gene da lipoproteína de 47 kDa) e de subtipagem (gene *tp*) de *Treponema pallidum*. Comparando as técnicas serológicas, verificou-se que a taxa de concordância entre os testes não treponémicos foi de 98,5% e de 97,1% para os testes treponémicos. Constatou-se que a sensibilidade das técnicas de RPR, de VDRL e de TPHA foi de 71,4, 74,5 e 98%, respectivamente. A especificidade foi de 97,2% para o teste RPR e para o VDRL e de 96,3% para o TPHA. A PCR diagnóstica evidenciou uma fraca sensibilidade pois, das 90 amostras testadas, apenas foram identificados seis casos de infecção por *Treponema pallidum*. A análise por PCR-RFLP revelou um perfil para uma das amostras mas, não correspondendo a qualquer subtipo descrito, deverá ser confirmada por sequenciação. Os resultados obtidos, e estudos efectuados por outros investigadores, parecem demonstrar a necessidade de desenvolver testes mais eficazes para o diagnóstico das fases assintomáticas da sífilis, de modo a ser possível um diagnóstico mais correcto e eficaz que contribuirá para um melhor controlo da doença.

Palavras-chave: *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*; sífilis; diagnóstico; testes serológicos; PCR diagnóstica; subtipagem genómica.

ABSTRACT

The etiological agent of syphilis, *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, is a helicoidal bacterium, with a characteristic corkscrew movement. Humans are the only natural host, in whom it causes a sexually transmitted infection. The diagnosis is essentially based on the association of clinical signs and symptoms with the serological tests, since it is impossible to cultivate this microorganism. Several PCR techniques have been described but their sensitivity and specificity during asymptomatic phases are still very low. Thus, the objectives of this study were to compare the diagnostics obtained by four serological tests and perform the optimization of a PCR diagnostic technique (47 kDa lipoprotein gene), as also of a *T. pallidum* subtyping PCR technique (*tpr* gene), in order to apply them to several clinical samples, collected from individuals suspected of having syphilis. After comparing the serological techniques, we verified a concordance rate of 98.5% for the nontreponemal tests and 97.1% for the treponemal tests. The sensitivity of the RPR, VDRL and TPHA techniques was 71.4%, 74.5% and 98%, respectively. Specificity was 97.2% for the RPR and VDRL techniques, while for the TPHA was 96.3%. The diagnostic PCR technique showed a low sensibility since, from the 90 test samples, only six cases of infection by *Treponema pallidum* were identified. The PCR-RFLP analysis revealed a profile for one of the samples but, since it does not match any of the described subtypes, it should be confirmed by sequencing. The results obtained, along with studies made by other investigators, appear to show the need for developing more effective tests for the diagnosis of asymptomatic phases of syphilis, in view of a better and more efficient diagnosis that will contribute for a better disease control.

Keywords: *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*; syphilis; diagnosis; serological tests; PCR diagnosing; genomic subtyping.

ÍNDICE

Lista de Tabelas	VII
Lista de Figuras	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Contextualização Histórica	1
1.2. Características do Agente	1
1.2.1. Taxonomia e Classificação	1
1.2.2. Características do Género <i>Treponema</i>	2
1.2.3. Características de <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i>	2
1.3. Patogenicidade e Imunidade	4
1.4. Transmissão, Ocorrência e Epidemiologia	5
1.5. Evolução Natural da Doença e Manifestações Clínicas	6
1.5.1. Complexo Primário	7
1.5.2. Sífilis Secundária	8
1.5.3. Sífilis Latente	8
1.5.4. Sífilis Terciária	9
1.5.5. Sífilis Congénita	10
1.6. Diagnóstico Clínico e Laboratorial	10
1.6.1. Método de Detecção Directa de <i>Treponema pallidum</i>	11
1.6.2. Métodos Serológicos	12
1.6.3. Métodos de Biologia Molecular	14
1.7. Tratamento, Prevenção e Controlo	15
1.8. Enquadramento do Tema e Objectivos Gerais do Estudo	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS	17
2.1. População e Amostras	17
2.2. Pesquisa de Anticorpos Anti- <i>Treponema pallidum</i>	18
2.2.1. Testes Serológicos Não-Específicos	19
2.2.2. Testes Serológicos Específicos	20
2.3. Pesquisa de DNA de <i>Treponema pallidum</i>	22
2.3.1. Extracção de DNA Total	22
2.3.2. Amplificação de DNA de <i>Treponema pallidum</i> - PCR Diagnóstica	23
2.3.3. Subtipagem Genómica de <i>Treponema pallidum</i> - 'Nested' PCR	24

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3.1. Pesquisa de Anticorpos Anti- <i>Treponema pallidum</i> no Sangue	26
3.1.1. Análise Geral	26
3.1.2. Comparação dos Testes Serológicos	27
3.1.3. Estudo da Sensibilidade e Especificidade dos Testes Serológicos	28
3.1.4. Testes Serológicos - Padrão de Infecção	30
3.2. Pesquisa de Anticorpos Anti- <i>Treponema pallidum</i> no Liquor	33
3.3. Pesquisa de DNA de <i>Treponema pallidum</i>	34
3.3.1. Amplificação de DNA de <i>Treponema pallidum</i> - PCR Diagnóstica	34
3.3.2. Subtipagem Genómica de <i>Treponema pallidum</i> - 'Nested' PCR	35
3.3.3. Testes Serológicos <i>versus</i> Técnicas Moleculares	37
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	39
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
6. ANEXOS	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização da população estudada.	18
Tabela 2. Reactividade dos soros estudados obtida com os testes RPR e TPHA.	26
Tabela 3. Comparação da reactividade obtida (409 soros) com os testes RPR e TPHA.	26
Tabela 4. Comparação da reactividade obtida (206 soros) com os testes RPR e VDRL.	27
Tabela 5. Comparação da reactividade obtida (206 soros) com os testes TPHA e FTA-Abs.	28
Tabela 6. Sensibilidade e especificidade do teste RPR em comparação com o teste FTA-Abs-G.	29
Tabela 7. Sensibilidade e especificidade do teste VDRL em comparação com o teste FTA-Abs-G.	29
Tabela 8. Sensibilidade e especificidade do teste TPHA em comparação com o teste FTA-Abs-G.	30
Tabela 9. Número de casos de acordo com as diferentes combinações serológicas possíveis com os quatros tipos de testes utilizados neste estudo.	31
Tabela 10. Comparação da reactividade obtida (18 líquidos) com os testes RPR e TPHA.	34
Tabela 11. Resultados serológicos e moleculares das amostras amplificadas pela técnica de PCR diagnóstica.	38
Tabela Suplementar 1. 'Primers' utilizados nas reacções de PCR.	44
Tabela Suplementar 2. Reacções de PCR (33) realizadas para optimização da técnica de PCR diagnóstica Multiplex.	44
Tabela Suplementar 3. Reacções de PCR (29) realizadas para optimização da técnica de subtipagem por 'Nested'- PCR.	45
Tabela Suplementar 4. Reacções (5) realizadas para optimização da técnica de RFLP.	45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Visualização em gel de agarose dos produtos amplificados a partir de DNA extraído das amostras de soros e de LCR pela técnica de PCR. 35
- Figura 2.** Visualização em gel de agarose dos produtos amplificados pela técnica de PCR 'Outer'. 36
- Figura 3.** Visualização em gel de agarose dos produtos amplificados pela técnica de PCR 'Inner'. 36
- Figura 4.** Visualização em gel de agarose dos padrões de RFLP obtidos com a enzima de restrição *Mse I* aplicada aos produtos de 'nested' PCR do DNA de *Treponema pallidum* existente numa amostra clínica e no controlo positivo. 37

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização Histórica

O aparecimento da sífilis na Europa como pandemia catastrófica, de início súbito, remonta ao fim do século XV (1494/1495), existindo várias teorias sobre o seu surgimento. No entanto, a teoria dita “Colombiana” é a genericamente aceite [23]. Esta defende o início da doença na Europa após a chegada dos marinheiros de Cristovão Colombo regressados, em 1493, do continente americano, também denominado de “Novo Mundo” [3, 26, 48]. A associação entre estes dois acontecimentos foi baseada na coincidência temporal, no modo de desencadeamento da pandemia e na respectiva disseminação. Pensa-se que a propagação da sífilis na Europa após a sua introdução foi, em larga escala, proporcionada pelas movimentações militares ao longo da guerra entre o rei D. Carlos VIII de França e o rei de Nápoles, dado que os mercenários que compunham ambos os exércitos eram provenientes de toda a Europa, disseminando a infecção quando regressaram às suas terras de origem [5]. Devido à sua vasta distribuição geográfica, a doença teve durante vários anos muitas designações, desde “doença espanhola” quando se disseminou por toda a Espanha, “doença francesa” quando surgiu em França, “mal de Nápoles” quando se instalou em Itália e “doença alemã” quando chegou à Alemanha [3, 5]. Devido à gravidade da infecção, esta foi denominada de ‘great pox’ durante os séculos XVI e XVII em contraste com a varíola, outra infecção prevalente na época conhecida como ‘small pox’ [52]. A designação de sífilis, adoptada genericamente a partir do século XVI, atribui-se a Girolamo Fracastoro (1478 - 1553), médico e poeta veneziano, que relatou em verso a história de um pastor com aquele nome - “*Syphilus sive morbus Gallicus*” - o qual se encontrava acometido pela doença [52]. Apesar da descrição clínica da sífilis [3] nesse poema, foi Joahannes Widman (1440 - 1524) quem reconheceu, pela primeira vez, a via de transmissão sexual da doença. Por sua vez, a etiologia da sífilis foi descoberta por Schaudinn e Hoffman em 1905, ao visualizarem espiroquetas em lesões iniciais de sífilis (úlceras) [3, 5, 15, 25].

1.2. Características do Agente

1.2.1. Taxonomia e Classificação

O agente etiológico da sífilis, *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, é uma espiroqueta patogénica pertencente à ordem *Spirochaetales* [26], a qual inclui três géneros com interesse clínico por causarem doença humana: *Treponema*, *Borrelia* e *Leptospira* [34].

1.2.2. Características do Género *Treponema*

Os microrganismos do género *Treponema* são bacilos finos, helicoidais, com 6 a 12 espiras regulares - vulgarmente comparados a “saca-rolhas” - afilados nas extremidades, que são constituídos por um cilindro protoplasmático, com flagelos periplasmáticos que percorrem longitudinalmente os microrganismos de extremo a extremo. São anaeróbios facultativos, móveis, possuindo movimentos de rotação e translação [48]. As pequenas dimensões destes microrganismos (6 a 20 µm de comprimento e 0,1 a 0,18 µm de diâmetro) [24, 48] não permitem a sua visualização ao microscópio óptico de fundo claro, pois estão além do poder de resolução deste aparelho, sendo apenas observáveis por microscopia óptica de fundo escuro [26] ou microscopia electrónica [5]. Estes microrganismos possuem uma parede celular estruturalmente semelhante à das bactérias de coloração Gram-negativa [52]. São formados por um cilindro protoplasmático composto por protoplasma, membrana citoplasmática, uma camada de peptidoglicano e espaço perisplasmático [24, 26, 48].

Treponema pallidum engloba quatro espécies que representam um problema para a saúde pública por desenvolverem diversas doenças no Homem: *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* responsável pela sífilis venérea; *Treponema pallidum* subsp. *pertenue* causador da framboésia (boubas); *Treponema pallidum* subsp. *endemicum* agente da sífilis endémica e *Treponema pallidum* subsp. *carateum* agente etiológico da pinta [34]. *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* pode ser distinguido das outras espécies pelas manifestações clínicas causadas e, mais recentemente, por diferenças genéticas [26].

1.2.3. Características de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*

Características Morfológicas e Estruturais

À semelhança das outras espiroquetas, *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* é formada por uma dupla membrana, externa e interna (ou citoplasmática) [24, 26, 48]. A membrana externa compõe a superfície celular do microrganismo funcionando como uma barreira protectora em relação ao meio envolvente [5, 30]. Era de supor que nela existissem vários elementos responsáveis pela patogenicidade/virulência, à semelhança do que acontece com as bactérias de coloração Gram-negativa, mas apresenta um índice de antigenicidade baixo, talvez pelo facto de não possuir lipopolissacáridos (LPS) como os que existem nas bactérias de coloração Gram-negativa [4, 16, 26, 37].

Por sua vez, a membrana citoplasmática, que é estruturalmente idêntica à das bactérias de coloração Gram-negativa [52], envolve o protoplasma e é composta, essencialmente, por numerosas lipoproteínas imunogénicas [51, 53], por proteínas de

ligação à penicilina (PBP) [44], e por cardiolipinas (fosfolípidos acídicos) [30, 45], sendo estas últimas os principais componentes antigénicos do antígeno do tipo Wasserman [26] que é utilizado no diagnóstico serológico da sífilis não treponémico. Apesar de todos estes componentes, a sua antigenicidade é fraca devido à arquitectura estrutural incomum que dificulta o acesso dos anticorpos às diversas proteínas [5].

Este microrganismo possui, também, três flagelos que são órgãos responsáveis pela locomoção e que se encontram localizados no espaço periplasmático [24, 48], pelo que são muitas vezes denominados de flagelos periplasmáticos ou endoflagelos [5, 26]. Estes enrolam-se à volta do cilindro protoplasmático, entrecruzando-se ao nível da região central da bactéria, percorrendo o microrganismo de uma extremidade à outra [5, 24, 26]. São estas as estruturas responsáveis, não só pelo movimento helicoidal do microrganismo e sua respectiva progressão activa [26, 48], mas também pela indução de uma resposta imunológica, devido à natureza antigénica das proteínas flagelares que são reconhecidas pelos anticorpos de indivíduos infectados [5, 26].

A sua mobilidade pode ser considerada, então, um factor de virulência [26], pois é devido a ela que *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* consegue penetrar a pele e as mucosas e assim disseminar-se pelo hospedeiro.

Para além de todas estas estruturas, as espiroquetas apresentam outros elementos citoplasmáticos, como filamentos de estrutura fibrilar, localizados abaixo da membrana citoplasmática, ribossomas, mesossomas, vacúolos e regiões nucleares [5].

Características Genómicas e Metabólicas

Com base na sequenciação completa do genoma de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, estirpe de Nichols (1998) [5], foi possível saber que o seu 'Deoxyribonucleic Acid' (DNA) é constituído por um único cromossoma circular de 1,138,006 pares de bases [23, 26, 35], sendo 92,2% do genoma composto por sequências de codificação ('Open Reading Frames' - ORF) [5] apresentando uma percentagem de guanina/citosina de 52,8% [35].

À semelhança da maior parte dos microrganismos, *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* possui no seu genoma um conjunto de genes que asseguram os processos essenciais que permitem ao microrganismo sobreviver, tais como a replicação do DNA, a transcrição deste, a tradução do 'Ribonucleic Acid' (RNA) e a eliminação das formas tóxicas do oxigénio através da enzima oxidase 'Nicotinamide adenine dinucleotide' (NADH) [5]. Em relação à produção de energia sobre a forma de 'Adenosine Triphosphate' (ATP), esta está confinada, exclusivamente, à via glicolítica [26]. Com base nestes factos, concluímos que o genoma da bactéria apresenta algumas limitações génicas no que diz respeito à produção

tanto de nutrientes como de energia (ATP), pelo que a maior parte das vezes a fonte de aquisição dos compostos nutritivos é o próprio hospedeiro [26].

Características Culturais

Treponema pallidum subsp. *pallidum* não consegue sobreviver fora do seu hospedeiro natural [26], dado que é extremamente sensível às condições do meio ambiente (temperatura, oxigénio e pH) e aos agentes físicos e químicos [5]. Deste modo, um dos principais inconvenientes no processamento laboratorial é o facto de não se conseguir cultivar *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* em meios de cultura ditos artificiais [5]. O método mais utilizado para manter e reproduzir o microrganismo *in vivo* é através da inoculação num modelo animal de laboratório [48]. O animal de eleição para este efeito é o coelho, porque apresenta um padrão de infecção idêntico ao do Homem [26, 42], pelo que se inocula a denominada estirpe de Nichols no testículo do coelho [42] para permitir a sua multiplicação *in vivo*. *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* tem um tempo de duplicação de 30 a 33 horas *in vivo*, assumindo-se que a taxa de divisão deste microrganismo é lenta [26, 42].

1.3. Patogenicidade e Imunidade

Para que qualquer microrganismo consiga sobreviver no hospedeiro precisa de ter vários factores de virulência e/ou de protecção. No entanto, nem todos os microrganismos utilizam estes factores da mesma maneira, podendo variar quer no tipo de factores, quer no modo de actuação destes, pelo que cada microrganismo interage de maneira diferente com o hospedeiro.

Treponema pallidum é uma bactéria que, caracteristicamente, possui uma baixa toxicidade, embora com uma elevada capacidade de invasão [5, 26].

No que diz respeito à toxicidade, *Treponema pallidum* distingue-se de outras bactérias patogénicas, que produzem toxinas e que possuem sistemas de secreção de proteínas, por não produzir exotoxinas ou LPS [16], nem ter os sistemas que segregam os factores de virulência, sendo assim classificado como um microrganismo não toxigénico [5, 26].

A capacidade que a bactéria tem de invadir e colonizar o hospedeiro está relacionada com sua mobilidade, aderência, penetração, consequente disseminação hematogénica e evasão ao sistema imunitário [16, 26].

Treponema pallidum possui proteínas de superfície que interagem com o hospedeiro e que possibilitam a adesão deste aos tecidos [26]. Posteriormente, ocorre a invasão

tecidual e *Treponema pallidum*, com o seu movimento peculiar em “saca-rolhas”, penetra as camadas de células epiteliais e/ou as superfícies das mucosas do organismo [26]. No local da inoculação a bactéria começa a multiplicar-se e a disseminar-se através dos vasos sanguíneos e dos vasos linfáticos [42, 48]. Pensa-se que a penetração interjuncional ao nível do endotélio vascular [26] é a causa pela qual o microrganismo consegue alcançar de um modo tão eficiente os vários tecidos do hospedeiro [5] após ter ocorrido a disseminação hematogénica. No genoma de *Treponema pallidum* foram identificados 67 genes que, eventualmente, são responsáveis pelo carácter patogénico do microrganismo [5]. Neste conjunto de genes realça-se um grupo, os genes *tpr* [22], que codifica várias proteínas, entre as quais se destacam as proteínas de superfície, como porinas e adesinas [26]. O número, a organização e a variabilidade destas proteínas, que se localizam na superfície bacteriana, podem representar um sistema de variação antigénica que dificulta o reconhecimento de *Treponema pallidum* por parte do sistema imunitário, sendo por isso considerado um mecanismo de evasão imune [12, 16, 22, 46].

Perante a presença de *Treponema pallidum* no organismo do hospedeiro, este desencadeia uma resposta imunitária contra o agente. Embora esta resposta não esteja muito bem estudada [48] envolve mecanismos tanto humorais (produção de anticorpos contra antígenos treponémicos) como celulares (alterações histológicas características das lesões sífilíticas) [43].

Deste modo, no início da infecção, a primeira linha de defesa do hospedeiro contra o microrganismo é a produção de imunoglobulinas tipo M e tipo G (IgM e IgG) contra antígenos de superfície, sendo a produção das IgM substancialmente superior à das IgG (70% de IgM e 20% de IgG) e o seu aumento mais precoce (7 a 20 dias) quando comparado com o das IgG (quarta semana) [43, 48]. Após se efectuar o tratamento as IgM desaparecem de circulação. No entanto, as IgG mantêm-se sendo produzidas por células imunocompetentes com memória [43, 48].

Numa fase mais avançada pode existir uma reacção imunoalérgica do tipo IV - reacção granulomatosa tecidual - que é responsável pelas lesões sífilíticas destrutivas em vários órgãos e que ditam a gravidade da doença [48]. Estas lesões possuem, independentemente do estado evolutivo da infecção, infiltrados celulares constituídos por linfócitos, macrófagos e células plasmáticas, que contribuem para a deformação vascular [3, 43].

1.4. Transmissão, Ocorrência e Epidemiologia

A sífilis é uma infecção sexualmente transmissível (IST) atingindo essencialmente a população sexualmente activa numa faixa etária compreendida entre os 20 e 30 anos de

idade [48, 52]. Além da transmissão pelo contacto sexual (vaginal, oral, anal) também pode existir transmissão vertical da mulher grávida infectada para o feto [20, 26] e através da transfusão de sangue contaminado, embora menos provável actualmente uma vez que na maioria dos países as amostras de sangue para serem utilizadas em transfusão de sangue são testadas para a pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum* [5, 42].

A sua prevalência e incidência variam substancialmente consoante as áreas geográficas do globo. No entanto, existe uma diferença entre os países industrializados e os países em desenvolvimento, onde os últimos apresentam uma taxa de incidência mais elevada relativamente aos primeiros [5]. Deste modo, as incidências maiores de sífilis focam-se na África subsahariana (1,37%) e na América do Sul e Central (0,52%). Na Europa e América do Norte os valores são idênticos e relativamente mais baixos (0,09%) [48].

O ponto alto da incidência da sífilis ocorreu durante o século XX enquanto decorria a guerra de 1937 - 1945 [48]. Contudo, verificou-se uma diminuição significativa após este período, justificado pelo aparecimento e utilização da penicilina (1943) [52]. Com a melhoria dos serviços médicos e da terapêutica profilática, juntamente com a eficácia do novo fármaco, acreditava-se mesmo que esta doença se viesse a extinguir, o que não aconteceu. Nos anos 60 e 70 observou-se um reaparecimento da doença luética, associado em parte à toxicodependência, prostituição e homossexualidade [5, 34, 48, 52]. Nos anos 80, surgiu a infecção pelo 'Human Immunodeficiency Virus' (HIV) [5] e pensou-se que o apelo para as práticas de sexo seguro (como o uso de preservativo) e a alteração dos comportamentos de risco fariam aumentar essas mesmas práticas com consequente diminuição da incidência de IST's, incluindo a sífilis [48]. Estes motivos foram em parte responsáveis pela diminuição da infecção sífilítica nos anos 90 em vários países industrializados [48]. No entanto, nos dias de hoje o cenário volta a inverter-se e verifica-se um aumento da sua incidência [48] devido ao reaparecimento dos comportamentos de risco e a uma diminuição das campanhas de prevenção.

1.5. Evolução Natural da Doença e Manifestações Clínicas

O curso clínico da sífilis evolui através de fases, períodos de actividade onde estão presentes sintomas - denominados de sífilis sintomática - e períodos de silêncio clínico, ou seja, sem sintomatologia - chamados de sífilis latente - sendo que cada um destes estádios clínicos apresenta manifestações clínicas e patologias diferentes [26, 48]. A doença passa para um estado crónico quando a sífilis adquirida não é tratada precocemente [5]. Ao longo da evolução da doença podemos distinguir uma fase inicial extremamente infecciosa e com manifestações clínicas variadas, a sífilis recente [48]. Após o segundo ano, a partir do

contágio, o carácter contagioso vai desaparecendo e a expressão clínica torna-se mais discreta, permanecendo durante mais tempo, a sífilis tardia [48].

1.5.1. Complexo Primário

Inicialmente, ocorre a inoculação de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* pela relação sexual, onde existe contacto directo da pele ou das mucosas com lesões contagiosas [5]. No local da inoculação da bactéria começam a aparecer as primeiras manifestações clínicas que correspondem ao complexo primário [26, 42]. Este inclui sempre a tríade característica, ou seja, o acidente primário (úlceras), a linfadenopatia satélite [28] e a espiroquetémia [5]. Posteriormente, segue-se o período de incubação com, aproximadamente, três a quatro semanas durante as quais não há quaisquer manifestações clínicas, ou se existem são muito subtis (febre) [48].

O acidente primário é um nódulo erosionado, geralmente único, duro, indolor e de 0,5 a 1,0 cm de diâmetro [28, 48, 52]. A erosão é superficial, dura à apalpação e limpa, podendo apenas conter algum exsudado de aspecto brilhante [48, 52]. A úlcera situa-se, a maior parte das vezes, nas regiões genitais externas, mas pode ter outras localizações. Na mulher, esta encontra-se na vagina ou mais usualmente no colo do útero; no homem, a zona preferencial da úlcera é o sulco balanoprepucial [5] e no caso dos homossexuais a localização mais comum do acidente primário é a zona rectal, anal [48] e oral [26].

No que diz respeito à linfadenopatia satélite esta é unilateral e inguinal, se o acidente primário for genital ou perigenital [3, 5, 48]. O(s) gânglio(s) pode(m) estar aumentado(s) de volume, mas nenhum deles sobressai em relação aos outros. Estes apresentam-se duros, indolores, não inflamados e não aderentes aos planos superficiais ou profundos [5, 48].

Treponema pallidum subsp. *pallidum* começa a sua multiplicação por divisão binária no local de entrada, demorando cerca de 33 horas [26, 42]. Dissemina-se de seguida para os vasos linfáticos e sanguíneos [3, 5, 26] - espiroquetémia - pelo que se diz que a sífilis é, praticamente desde o início, uma infecção sistémica altamente contagiosa devido à existência de treponemas nas lesões [5].

O acidente primário tende a cicatrizar e a linfadenopatia satélite a desaparecer naturalmente num período entre 10 a 14 dias [48]. Tal facto leva o doente, muitas vezes, a negligenciar a situação não recorrendo ao clínico, entrando-se depois numa fase de “silêncio” clínico - segundo período de incubação - que pode demorar 10 a 90 dias [26].

1.5.2. Sífilis Secundária

Alguns doentes com sífilis primária não tratada (25 a 35%) progridem para sífilis secundária [3], também denominada simplesmente de “secundarismo” [5].

O secundarismo está associado à disseminação da infecção por todo o organismo [3, 26, 42], sendo acompanhado de um enorme número de manifestações clínicas. No início, estas são gerais mas extremamente visíveis e correspondem a febre alta, artralgias, anorexia, sudação profusa, prostração e uma rápida perda de peso [5, 26, 48, 52]. Associada a estas manifestações surge ainda uma micropoliadenia das cadeias ganglionares superficiais com gânglios duros, indolores e não inflamatórios e um cenário dermatológico muito variado, no que diz respeito ao ritmo de aparecimento/desaparecimento, duração, intensidade e padrões morfológicos [48]. As lesões da pele e/ou das mucosas que surgem neste período são consequência directa da libertação e da respectiva circulação dos treponemas no sangue no decurso da sífilis primária [5]. Estas são, por regra, não pruriginosas, e podem ir desde exantemas maculares [3, 5, 26] também chamados de roséolas - manchas pequenas, ovulares, rosadas, disseminadas, resolutivas e fugazes - [3, 48] a erupções papulosas, que incluem exantema maculo-papular, papular e pustuloso [3, 5, 26], sendo caracterizadas por pápulas ovulares, infiltradas, duras, eritematosas, de tonalidade acobreada e indolores [3, 48].

Nas regiões húmidas (genitais, períneo e comissuras labiais), e geralmente perto do acidente primário, as lesões têm um aspecto papular esbranquiçado - condilomas planos - devido à disseminação directa da bactéria a partir do seu local de entrada [3, 5]. Além deste quadro clínico característico, os doentes podem ainda apresentar lesões na língua, lábios e boca, manifestações nas zonas oculares e pilosas, dores ósseas e articulares, tinitus bilateral e surdez [5, 26]. Pode também ocorrer um envolvimento hepático e renal [5, 26], que pode levar a icterícia e proteinúria. No entanto, todos estes sintomas se vão atenuando com o tempo, até se tornarem “silenciosos”, entrando o doente numa fase de latência onde a infecção passa de aguda a crónica. À semelhança da fase primária também este estágio é altamente contagioso [5], acreditando-se ser a fase mais contagiosa da sífilis pelo grande número de treponemas existentes em circulação.

1.5.3. Sífilis Latente

Após os sintomas do complexo primário e da fase secundária desaparecerem espontaneamente num período de três meses [26], a fase de latência instala-se [42].

Durante esta fase da infecção a doença continua activa, podendo ser comprovada pela reactividade serológica dos testes treponémicos. No entanto, é assintomática, uma vez

que não existem manifestações clínicas visíveis [48, 52]. A fase de latência pode ser dividida, com base na sua evolução, em sífilis latente recente - menos de um ano de evolução - 'Centers for Disease Control' (CDC) - ou menos de dois anos de evolução - 'World Health Organization' (WHO) - e sífilis latente tardia respectivamente, mais de um ano de evolução (CDC) ou mais de dois anos de evolução (WHO) [5]. A sífilis latente mantém-se no tempo até existir cura recorrendo a terapêutica ou até ocorrer evolução da doença para sífilis tardia - sífilis terciária [5, 26].

1.5.4. Sífilis Terciária

Presentemente a sífilis terciária é rara devido à terapia antibiótica [26]. No entanto, esta surge ainda em 25 a 35% dos doentes não tratados a partir de dois anos de evolução da doença [48]. Na maioria dos casos aparece muito mais tarde até 40 anos após a infecção inicial, com excepção dos doentes infectados com HIV, porque é uma doença inflamatória de evolução lenta. Surge em qualquer órgão [5, 26] devido à invasão dos treponemas na pele, sistema nervoso central, cardiovascular e ósseo, levando ao aparecimento nestes locais de lesões granulomatosas e outras complicações [26, 42, 48]. No entanto, é relevante referir que durante este estágio terciário a sífilis não é contagiosa.

Na sífilis cutâneomucosa terciária aparecem formações denominadas de tubérculos (nódulos dérmicos) e gomas (nódulos subcutâneos) que crescem lentamente e curam de forma gradual, deixando cicatrizes. Podem surgir por todo o corpo, mas as zonas abaixo do joelho, na parte superior do tronco e no couro cabeludo são as preferenciais [42, 48].

A sífilis osteoarticular provoca dores profundas e penetrantes, sendo caracterizada pelo aparecimento de periostite ou osteocondrite, com possível evolução para osteólise [42, 48].

Na sífilis cardiovascular, o doente pode desenvolver uma insuficiência da válvula aórtica ou calcificações e aneurisma da aorta. Este cenário pode causar dor no peito, insuficiência cardíaca ou morte [26, 42, 48].

Classicamente, as complicações neurológicas da sífilis têm sido associadas ao estado terciário da doença [26] e pressupõem, em *sensu lato*, a invasão do sistema nervoso central no decurso da bacteriemia que pode evoluir de formas distintas [48]. No entanto, alguns estudos têm demonstrado que a invasão do sistema nervoso central por *Treponema pallidum* pode ocorrer durante os primeiros estádios da doença [26]. Em indivíduos com HIV a eliminação de treponemas ocorre com maior dificuldade, podendo afectar o decurso natural da sífilis, o seu diagnóstico e tratamento [5, 14, 54]. Assim a co-infecção com o HIV pode levar ao aparecimento precoce de neurosífilis [6, 14]. No caso de existir invasão meníngea inicial, a doença pode evoluir para um dos seguintes cenários: neurosífilis

recente, meningite assintomática ou meningite aguda, que cura espontaneamente ou recorrendo a terapêutica; neurosífilis tardia, crónica, com um quadro característico de sífilis meningovascular ou neurosífilis parenquimatosa (tabes, paralisia geral) [42, 48].

1.5.5. Sífilis Congénita

A sífilis congénita é resultante da disseminação hematogénica transplacentária dos treponemas da mãe com sífilis para o feto [26, 52], sendo o risco de transmissão tanto maior quanto mais recente for a infecção materna [26, 48]. Esta problemática da sífilis na grávida começou a ganhar maiores contornos com o aumento de mulheres toxicodependentes e/ou portadoras de HIV que adquirem sífilis e que não dão a atenção devida ao acompanhamento clínico da gravidez [48]. Esta situação é de extrema gravidade, não só pelo aumento de partos prematuros e de nados-mortos como pela aquisição de sífilis congénita do recém-nascido [26, 48]. Também a sífilis congénita se pode subdividir em recente e tardia - menos de dois anos ou mais de dois anos de evolução, respectivamente - à semelhança da sífilis latente [26, 48, 52]. O recém-nascido pode não apresentar qualquer manifestação clínica e, só mais tarde se desencadearem as manifestações da doença, mas também pode nascer com sinais e sintomas da infecção. As manifestações incluem rinorreia purulenta (elevada concentração de treponemas) [26, 48], bolhas palmoplantares, erupções cutâneas maculares ou maculo-papulares disseminadas [26].

Caso a infecção não seja tratada pode originar, na região nasal, osteocondrite que irá provocar um aspecto típico do nariz em forma de “sela de montar” [48]. Se não existir tratamento durante o período recente a infecção por *Treponema pallidum* poderá atingir os vários órgãos e aparelhos, nomeadamente as meníngeas e os ossos longos (osteocondrite) [26]. No caso de sífilis congénita tardia podemos ter casos de meningite e manifestações provocadas pelo compromisso parenquimatoso cerebral. Como sequelas características deste período, temos a conhecida tríade de Hutchinson que inclui queratite intersticial, surdez labiríntica e alterações na dentição [26, 48].

1.6. Diagnóstico Clínico e Laboratorial

O diagnóstico da sífilis assenta, essencialmente, na complementaridade dos dados clínicos e dos resultados laboratoriais [5]. Porém, este demonstra-se complicado na prática clínica devido a períodos assintomáticos e de latência da doença e no processamento laboratorial; dado que *Treponema pallidum* não é cultivável em meios de cultura artificiais. Dentro destes dois pilares fundamentais, o diagnóstico clínico pressupõe uma anamnese (recolha de uma história clínica e sexual por parte do médico) e uma observação clínicas e o

diagnóstico laboratorial recai essencialmente na identificação do agente por microscopia e na presença de anticorpos anti-*Treponema pallidum*. A pesquisa de DNA bacteriano por técnica de PCR é ainda um método que não apresenta grande sensibilidade nas amostras de sangue e de líquido céfalo-raquidiano (LCR) pelo que não é um método de rotina a utilizar no diagnóstico laboratorial de sífilis [48]. Os métodos laboratoriais adoptados e a sua respectiva sensibilidade e especificidade dependem da fase em que se encontra a infecção [5].

1.6.1. Método de Detecção Directa de *Treponema pallidum*

Como método de detecção directa de *Treponema pallidum* a microscopia de fundo escuro é a técnica mais antiga [48], sendo contudo, bastante útil na identificação da espécie [3]. É um método de execução simples, que deve ser utilizado quando o doente tem lesões de sífilis primária, secundária e congénita recente, requerendo um microscopista experiente [5, 10]. Nestas situações, *Treponema pallidum* pode ser identificado e distinguido de outras espiroquetas devido às suas características dimensionais, morfológicas e de mobilidade peculiares [18]. Assim, esta espiroqueta, quando visualizada com microscopia de fundo escuro, apresenta-se com uma coloração branca sob a forma de bacilos finos helicoidais com espiras regulares (forma de “saca-rolhas”) e afilados nas extremidades. No que diz respeito à sua mobilidade, possui movimentos de translação (movimento em linha recta lento e uniforme), de rotação (movimento lento ou rápido, segundo o seu eixo longitudinal) e de flexão (movimento de contracção e distensão da estrutura bacteriana) [5]. Apesar do elevado contributo da microscopia de fundo escuro na identificação do agente, esta técnica possui algumas limitações no que diz respeito à sensibilidade [18]. Um resultado negativo não pode excluir o diagnóstico de sífilis, uma vez que este pode ter sido consequência de factores técnicos, terapêuticos ou de confusão com outras patologias [18], sendo assim, um falso negativo; assim como um resultado positivo não nos dá a certeza absoluta de que se trata de *Treponema pallidum*, podendo este ser confundido com outras espiroquetas não patogénicas, colocando-nos perante um falso positivo [5].

Outra técnica para a detecção de *Treponema pallidum* em amostras de lesões e de fluidos orgânicos é a técnica de imunofluorescência directa (‘Direct Fluorescent Antibody’ *Treponema pallidum*), podendo ser usada como alternativa à microscopia de fundo escuro. Nesta técnica os microrganismos são identificados por anticorpos anti-*Treponema pallidum* marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) [5]. Se existirem treponemas na amostra, estes ligam-se à antiglobulina anti-*Treponema pallidum* marcada com FITC, processo executado em lâmina, sendo observados com microscopia de fluorescência [5, 18]. Apesar da execução desta técnica ser mais complexa, tem a vantagem de ter uma

maior sensibilidade e especificidade que as de microscopia de fundo escuro [18]. Além disso, as amostras não têm de ser observadas imediatamente após a colheita, tal como é obrigatório por microscopia de fundo escuro [5, 18].

1.6.2. Métodos Serológicos

A serologia (pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum*) é a técnica mais usada no diagnóstico laboratorial de sífilis [10], sendo considerada uma metodologia indirecta de diagnóstico, por identificar anticorpos produzidos pelo hospedeiro como resposta à infecção por *Treponema pallidum* [5]. Estes elementos começam a ser sintetizados e detectados a partir do aparecimento dos sinais e sintomas clínicos, embora alguns doentes e alguns testes possam apresentar reactividade pouco antes deste período, aumentando a sua concentração no estágio secundário. No decorrer da infecção são produzidos dois tipos de anticorpos, os “não treponémicos” ou também denominados de “não específicos” (fosfolípidos e cardiolipinas) e os “treponémicos” ou “específicos” [5]. Devido a este facto, os testes serológicos estão divididos em testes “não treponémicos” e testes “treponémicos”.

Testes Serológicos Não-Específicos

Os testes “não treponémicos” detectam anticorpos do tipo IgG e IgM, que aparecem como consequência reactiva às substâncias fosfolipídicas libertadas na destruição tecidual do endotélio vascular durante a infecção sífilítica ou como resposta à cardiolipina e a lipoproteínas (elementos estruturais libertados pela bactéria) [18]. Estes testes de flocculação possuem uma menor especificidade e uma maior sensibilidade quando comparados com os testes que utilizam antígenos de treponemas. São de fácil execução e de baixo custo e permitem informação qualitativa e quantitativa [10, 48].

Dentro desta categoria de testes, os que mais se utilizam são o ‘Venereal Disease Research Laboratory’ (VDRL) e o ‘Rapid Plasma Reagin’ (RPR) em que o antígeno utilizado é uma solução alcoólica de cardiolipina, colesterol e lecitina purificada [26], juntamente com partículas de carvão que tornam a reacção visível a “olho nú”. Pelo contrário, a leitura do VDRL só se pode efectuar ao microscópio óptico [18]. Geralmente, quando se efectuam os testes qualitativos utiliza-se soro não diluído, uma vez que apenas se pretende observar a presença ou ausência de anticorpos [48]. Por sua vez, nos testes quantitativos, o soro vai sofrendo diluições seriadas até ao ponto em que não exista reactividade, anotando-se o título de diluição mais alta que apresenta reactividade completa [18, 48]. Este aspecto é útil para implementar e ajustar a terapêutica [11], como no caso de sífilis [48]. Deve ter-se em

conta o fenómeno de “prozona” em que um soro não diluído não apresenta reactividade por ter um excesso de anticorpos que bloqueiam o antígeno. Nesta situação procede-se à diluição do mesmo até ao aparecimento de reactividade [18].

Testes Serológicos Específicos

Os testes “treponémicos” detectam anticorpos séricos específicos dado que utilizam como antígeno ou *Treponema pallidum* ou alguns dos seus constituintes [18]. Estes testes possuem não só um elevado grau de especificidade como são mais sensíveis do que os testes “não treponémicos” [48]. Contudo, são testes com um procedimento mais complexo e monetariamente mais caros do que os testes “não treponémicos”, pelo que não servem, do ponto de vista prático, como métodos de rastreio. Por outro lado, como se mantêm reactivos durante toda a vida, também não se podem usar na monitorização da terapêutica [11, 48]. Assim sendo, estes testes são utilizados para confirmar a positividade dos testes “não específicos” [5, 11] devido à sua maior especificidade.

Os testes “treponémicos” utilizados mais frequentemente são o ‘*Treponema pallidum* Haemmagglutination Assay’ (TPHA) [28] e o ‘Fluorescent *Treponema* Antibody Absorbed’ (FTA-Abs) [18].

O TPHA é uma técnica de aglutinação em microplaca que utiliza eritrócitos de galinha sensibilizados com extractos de *Treponema pallidum* como antígeno para a detecção de anticorpos anti-*Treponema pallidum* [26]. Quando existem anticorpos no soro estes vão aglutinar-se aos eritrócitos sensibilizados, formando uma espécie de rede difusa na placa. Por sua vez, na ausência de anticorpos não ocorre aglutinação e os eritrócitos acabam por sedimentar em forma de “botão” no fundo da microplaca [18]. Este é um teste com elevada sensibilidade, com carácter qualitativo e quantitativo e que exige grandes diluições do soro [48]. Como a reactividade deste se mantém durante toda a vida este teste não se pode aplicar para o controlo evolutivo da doença, mas apenas como teste qualitativo. Também por se manterem reactivos durante toda a vida podem dificultar o diagnóstico futuro de uma reinfeção.

O FTA-Abs é um método de imunofluorescência indirecta que usa como antígeno uma suspensão de treponemas mortos (*Treponema pallidum* estirpe de Nichols) que se coloca em contacto com o soro do doente. Quando no soro estão presentes anticorpos, ocorre a ligação antígeno-anticorpo que passa a ser visível porque ocorre a ligação de um anticorpo anti-humano que possui acoplado uma fluoresceína, permitindo a observação, ao microscópio de fluorescência, de treponemas fluorescentes [18, 26]. À semelhança do TPHA, este é um teste meramente qualitativo porque apenas nos indica que o doente tem sífilis ou que já teve, dado que a positividade se mantém toda a vida [48].

Na prática clínica e laboratorial corrente recomenda-se, para o diagnóstico de sífilis, a utilização simultânea de um teste “não treponémico” e de um teste “treponémico” [5, 10, 11].

1.6.3. Métodos de Biologia Molecular

A biologia molecular é uma ciência centrada essencialmente no estudo da estrutura e função do material genético e dos seus produtos de expressão (proteínas). De um modo mais concreto, a biologia molecular investiga as relações entre os vários sistemas celulares, incluindo a interacção entre DNA, RNA e síntese proteica. É um campo de estudo muito vasto que engloba outras áreas da biologia e da química, em particular genética e bioquímica. A era da biologia molecular tem permitido dar passos largos na ciência e na investigação, pelo que é uma área de grande investimento intelectual, científico e monetário. Das várias técnicas utilizadas na biologia molecular, uma das que teve maior impacto pela sua vasta utilidade foi a reacção em cadeia da polimerase ou em inglês ‘Polymerase Chain Reaction’ (PCR). É um método de amplificação do DNA *in vitro* que permite a detecção de sequências específicas de DNA alvo em indivíduos infectados por um agente, neste caso específico por *Treponema pallidum*. Esta técnica engloba três fases: na primeira, as amostras são tratadas para produzir a separação das cadeias de DNA (desnaturação), na segunda fase são adicionadas as sequências iniciadoras (‘primers’), que se devem moldar às cadeias que contêm as sequências alvo (moldagem) e na terceira fase, os ‘primers’ estendem devido à polimerase para a produção de novas cadeias de DNA complementares (extensão). As mesmas fases repetem-se para produzir mais cadeias de DNA.

Vários investigadores têm descrito diversas técnicas de PCR como um método de identificação de *Treponema pallidum* (e por isso, de grande potencialidade no diagnóstico de sífilis) e como meio de subtipagem de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* [5]. Tal potencialidade prende-se ao facto de permitir um diagnóstico laboratorial por identificação do agente, de especial importância nas fases assintomáticas da doença nas quais o agente se encontra em circulação mas não causa sintomas, dificultando o diagnóstico clínico, e por poder ser utilizada em diversos tipos de amostras clínicas [48] como fluidos (sangue, soro, liquor, líquido amniótico) e tecidos, incluindo os tecidos parafinados. No entanto, tem uma sensibilidade baixa, apresenta dificuldades técnicas e custos elevados pelo que não é utilizada na rotina laboratorial [5].

A pesquisa de DNA de *Treponema pallidum* pela técnica de PCR pode ser utilizada com dois objectivos distintos, como acima referido, mas complementares - o de permitir somente a amplificação de DNA de *Treponema pallidum* (PCR diagnóstica) para diagnóstico de infecção e o de realizar subtipagem genómica de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*

para estudos epidemiológicos. No caso da técnica de PCR diagnóstica, a maioria dos testes utiliza ‘primers’ para genes que codificam lipoproteínas de membrana, como é o caso da proteína de 47 kDa e proteínas enzimáticas, onde está inserida a DNA polimerase I. No caso do gene da lipoproteína de 47 kDa (*Tp47*) o par de ‘primers’ utilizado é composto por KO3A-F (5'-AAGTTTGTCCCAGTTGCGGTT-3') e KO4-R (5'-AGAGCCATCAGCCCTTTTCA-3'), que amplificam um fragmento de 260 bp (‘base pair’) [36]. No que diz respeito ao gene da DNA polimerase I (*polA*), o conjunto de ‘primers’ escolhido é o polA-F (5'-AAGTTTGTCCCAGTTGCGGTT-3') e polA-R (5'-CACAGTGCTCAAAAACGCGTGACG-3') que sintetizam um fragmento de 378 bp [29]. Para a subtipagem genómica procede-se à análise do gene *tp* por ‘nested’ PCR e posterior restrição do produto (‘Restriction Fragment Length Polymorphism’ - RFLP) - PCR-RFLP [13, 41]. Para esta família polimórfica de genes *tp*, que codificam proteínas da membrana externa [25], recorre-se aos pares de ‘primers’ B1-F (5'-ACTGGCTCTGCCACACTTGA-3') e A2-R (5'-CTACCAGGAGAGGGTGACGC-3') para a primeira amplificação [39, 40], onde se origina um fragmento de 2186 bp, e aos ‘primers’ IP6-F (5'-CAGGTTTTGCCGTTAAGC-3') e IP7-R (5'-AATCAAGGGAGAATACCGTC-3') para a segunda amplificação, onde se sintetiza um fragmento de 1836 bp [39].

Apesar da elevada complexidade de execução e das visíveis dificuldades técnicas de optimização acredita-se que, no futuro, a técnica de PCR venha a ter uma vasta utilização com elevadas possibilidades de aplicação clínica.

1.7. Tratamento, Prevenção e Controlo

Ao longo do tempo, vários fármacos e metodologias foram propostas para o tratamento da sífilis. O primeiro composto foi o mercúrio e os seus respectivos derivados [5]. Este, apesar de atenuar os sintomas, não curava a doença, como ainda desencadeava reacções tóxicas graves [5]. Posteriormente, tentou substituir-se o mercúrio por bismuto ou por outros metais, mas sem grande sucesso [5]. Mais tarde, surgiu com Paul Ehrlich (1854 - 1915) e Sahachiro Hata (1873 - 1938) o diaxidiamidoarsenobenzol (Salvarsan), um derivado arsenical que passou a ser utilizado como fármaco de excelência para o tratamento da sífilis, essencialmente, por dois motivos: uma eficácia superior à do mercúrio e uma actuação directa sobre o agente bacteriano [5]. No entanto, este requeria não só doses elevadas, como um considerável número de injeções para a sua administração.

Em 1943, o panorama causado pela sífilis altera-se drasticamente pelo uso revolucionário da penicilina. Este passa a ser então o fármaco de eleição utilizado no tratamento da sífilis [26], uma vez que *Treponema pallidum* tem elevada susceptibilidade à penicilina, sem terem aparecido, até aos dias de hoje, estirpes resistentes ou mesmo menos sensíveis.

Na terapêutica actual, excluindo a neurosífilis, é recomendada a administração intramuscular de penicilina G benzatínica que apesar de originar níveis séricos pouco elevados são adequados e prolongados para que o antibiótico se difunda por todo o organismo [1, 48]. Quando se está perante um caso de neurosífilis a solução é aumentar a dose de penicilina solúvel através da via endovenosa para que esta atinja uma concentração eficaz a nível cerebral [1, 48].

Apesar destes serem os cenários terapêuticos mais usuais, a terapia deve ter sempre em conta as características do doente e o estado evolutivo da infecção. Deste modo, existem esquemas terapêuticos recomendados pelo 'Center of Disease Control and Prevention' (CDC - Atlanta, E.U.A) [1, 48], pela 'World Health Organization' (WHO) e pela 'European International Union against Sexually Transmitted Infections' [21].

Após o início da terapêutica com penicilina (quatro ou seis horas depois) pode surgir a denominada reacção de Jarisch - Herxheimer [42]. Os sintomas mais característicos desta reacção sistémica são os arrepios, febre, mialgias, cefaleias, taquicardia, hiperventilação, vasodilatação e hipotensão moderada. Pensa-se que a sua origem esteja na libertação em massa de toxinas microbianas quando da destruição dos treponemas [48], podendo durar no mínimo 12 a 24 horas. No entanto, tem um carácter auto-limitado [5].

Uma questão que se pode colocar é a terapêutica a adoptar perante a hipersensibilidade/alergia à penicilina. Nestes casos, umas das soluções existentes é a administração múltipla de outros antibióticos, nomeadamente doxiciclina ou tetraciclina (excepto em mulheres grávidas) [26], que requer uma maior adesão do doente à terapêutica pelo tempo de administração desta droga [5, 26]. Outra hipótese é realizar uma dessensibilização para depois iniciar o tratamento à base de penicilina especialmente quando se sabe que a adesão ou monitorização pós-terapêutica não vai ser assegurada por parte do doente [1].

Relativamente à prevenção e controlo da sífilis, estas assentam, essencialmente, em cinco pilares fundamentais: informação e educação pública; rastreios para sífilis e outras ISTs; diagnóstico, tratamento e acompanhamento do doente, sintomático e assintomático; notificação, avaliação, acompanhamento e aconselhamento dos parceiros sexuais dos doentes portadores de infecções transmitidas sexualmente e sua terapêutica [48]. No que diz respeito à informação e educação pública deve existir um conhecimento da doença luética e das respectivas fases contagiosas e não contagiosas e informação sobre práticas de sexo seguro [48] apelando ao uso constante do preservativo.

Os rastreios devem ter um carácter regular em determinadas situações e são uma chave importante para a prevenção de eventuais complicações da doença e para a prevenção da sífilis congénita e diminuição da respectiva transmissão [48].

Outro aspecto muito importante além do diagnóstico, tratamento e acompanhamento do indivíduo com sífilis, é a informação e aconselhamento do respectivo parceiro sexual de modo a evitar reinfeções e comportamentos de risco futuros. A orientação da profilaxia da sífilis tem por base as linhas condutoras da prevenção das infecções sexualmente transmitidas, que devem ter em conta os factores que influenciam a aquisição de IST's, nomeadamente, promiscuidade sexual relacionada com grande número de parceiros sexuais em função do tempo e uma elevada frequência na troca dos mesmos; toxicodependência e idade [48].

1.8. Enquadramento do Tema e Objectivos Gerais do Estudo

Tendo em conta os problemas existentes, e expostos anteriormente, relacionados com o diagnóstico de sífilis, a presente tese tem como principais objectivos apresentar a análise e discussão dos resultados obtidos relativamente a:

- Comparação das técnicas serológicas específicas e não específicas utilizadas para o diagnóstico de sífilis;
- Análise da sensibilidade e especificidade dos testes serológicos;
- Optimização de uma técnica de PCR para o diagnóstico de sífilis;
- Optimização do sistema de subtipagem para *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* com base no gene *tpr*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. População e Amostras

As amostras utilizadas neste estudo foram colhidas no Hospital Distrital de Santarém, EPE (HDS), no Hospital de Santa Maria (HSM), no Hospital de Egas Moniz (HEM), na Universidade de Lisboa (UL), na Universidade Nova de Lisboa (UNL), na Universidade Atlântica (UA) e num centro de acolhimento e orientação à mulher que se prostitui na rua (CAOMIO). As amostras obtidas nos hospitais foram provenientes de indivíduos com suspeita de sífilis, enquanto as das universidades e as do CAOMIO foram recolhidas em indivíduos que se submeteram, voluntariamente, a um rastreio de sífilis. A inclusão no estudo foi efectuada depois de obtido consentimento informado, não só para a colheita de amostras, e de exames laboratoriais, como para a recolha de dados epidemiológicos e clínicos relevantes para o presente estudo.

De um total de 424 (100%) indivíduos, 255 (60,1%) eram do sexo feminino e 156 (36,8%) do sexo masculino, com uma média de idades de 26 anos para o sexo feminino, das 253 mulheres com idade conhecida, e de 36 anos para o sexo masculino, dos 150 homens com idade conhecida. Sendo, deste modo, a média de idades dos dois grupos de 31 anos, oscilando entre os 18 e os 88 anos (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização da população estudada.

Origem	Indivíduos	Sexo Feminino	Sexo Masculino	Média de Idades	
				Sexo Feminino	Sexo Masculino
HDS	31	12	19	53	52
HSM	57	16	41	37	40
HEM	51	8	42	53	46
Universidades	251	185	54	22	22
CAOMIO	34	34	—	32	—
Total:	424	255	156	26	36
				Média de Idades: 31	

Relativamente aos produtos biológicos analisaram-se 409 amostras de soro, 34 de sangue, 18 de líquidos, 10 de plasma, duas de úlcera, duas de lesão secundária, duas de exsudado de biopsia do lóbulo da orelha e uma de um corte da planta do pé.

2.2. Pesquisa de Anticorpos Anti-*Treponema pallidum*

Por norma, para o rastreio de sífilis, e na prática corrente laboratorial deve efectuar-se um teste não específico para o rastreio inicial em associação com um teste específico que confirma o resultado obtido com o primeiro [5, 11]. Assim sendo, procede-se, inicialmente, à realização de um teste de flocculação que utiliza cardiolipina, colesterol e lecitina como antigénio para a detecção de anticorpos contra estes elementos, como é o caso do ‘Venereal Disease Research Laboratory’ (VDRL) e do ‘Rapid Plasma Reagin’ (RPR). Posteriormente, realiza-se um teste com antigénios treponémicos para a identificação de anticorpos anti-*Treponema pallidum*, nos quais se inclui o ‘*Treponema pallidum* Haemmagglutination Assay’ (TPHA) e o ‘Fluorescent *Treponema* Antibody Absorbed’ (FTA-Abs).

Para a realização dos testes serológicos usou-se soro obtido após a centrifugação do sangue, durante 10 min a 2500 rotações por minuto (rpm), guardando-o posteriormente em

'eppendorfs', a -20°C. Estes testes também foram aplicados a um pequeno número de amostras de liquor.

2.2.1. Testes Serológicos Não-Específicos

Teste VDRL - 'Venereal Disease Research Laboratory'

O 'kit' utilizado para a realização do teste de floculação foi o 'BD VDRL Test Control Serum Set' em que o antigénio é uma solução de cardiolipina, colesterol e lecitina, a qual foi sempre preparada no momento da execução da técnica. Para a preparação da solução antigénica colocou-se, num frasco de fundo plano, 0,4 ml de tampão salino VDRL e 0,5 ml de antigénio sob agitação lenta; no final, adicionou-se 4,1 ml de tampão salino VDRL e homogeneizou-se bem a mistura.

O teste foi executado em soros que foram descomplementados em banho-maria a 56°C, durante 30 min (no caso de amostras de liquor estas não precisaram de ser descomplementadas). A amostra não diluída foi misturada com o antigénio (50 µl de amostra e 20 µl de antigénio), sendo a pesquisa de anticorpos realizada em lâmina. Colocou-se a lâmina no agitador rotatório automático a 100 rpm, durante 4 min. A leitura foi efectuada ao microscópio óptico com a ampliação de 100X. O resultado foi considerado positivo quando se observou floculação - formação de agregados - e negativo quando não se visualizou formação de agregados. Todas as amostras que acusaram reactividade foram quantificadas através do mesmo procedimento do teste qualitativo, efectuando-se diluições seriadas de factor dois (50 µl de amostra e 50 µl de soro fisiológico). O título registado correspondeu à última diluição na qual se observou reactividade. Foi utilizado, em simultâneo com as amostras a testar, um soro reactivo e um soro não reactivo, funcionando como controlo positivo e controlo negativo, respectivamente. Em todos os passos do procedimento laboratorial foram seguidas as instruções do fabricante.

Teste RPR - 'Rapid Plasma Reagin'

O 'Macro-Vue® RPR Card Tests' foi o 'kit' adoptado para o teste de floculação RPR, em que a suspensão antigénica é estabilizada e composta por cardiolipina, colesterol, lecitina, partículas de carvão, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e cloreto de colina. O EDTA assegura a estabilização do antigénio, evitando a sua preparação na altura de execução do teste, o cloreto de colina faz com que os soros não tenham de ser inactivados antes do procedimento e as partículas de carvão tornam a reacção visível macroscopicamente. Colocou-se uma gota de amostra não diluída no círculo do cartão

fornecido, espalhando-a por toda a superfície do círculo, e adicionou-se uma gota de antigénio que fora previamente agitado. O cartão foi colocado no agitador rotatório automático a 100 rpm, durante 8 min. A leitura foi realizada sob boa fonte luminosa. O teste foi positivo quando se visualizou floculação - presença de “grumos” pretos - e negativo quando não se visualizou floculação. Todas as amostras positivas foram tituladas segundo a mesma metodologia do teste qualitativo, efectuando-se diluições seriadas de factor dois (50 µl de amostra e 50 µl de soro fisiológico). Anotou-se o título da maior diluição em que existiu reactividade. Utilizou-se sempre um controlo positivo e um controlo negativo, quando da realização do teste nas amostras, para verificar a correcta execução da técnica e o estado de conservação dos reagentes. Todas as etapas do procedimento laboratorial foram realizadas segundo o protocolo fornecido pela casa comercial.

2.2.2. Testes Serológicos Específicos

Teste TPHA - ‘*Treponema pallidum* Haemmagglutination Assay’

O ‘kit’ escolhido para o teste de hemaglutinação foi o ‘Newmarket Laboratories Ltd TPHA Tests’; este utiliza células de teste que são eritrócitos de galinha preservados e revestidos com antigénios de *Treponema pallidum* (estirpe de Nichols) e células de controlo, que são idênticas às células de teste mas que não se encontram revestidas com antigénios.

Para o rastreio das amostras colocou-se no primeiro poço 190 µl do diluente e 10 µl de amostra e misturou-se bem. Colocou-se 25 µl da amostra diluída no poço de controlo (segundo poço) e 25 µl no poço de teste (terceiro poço), e em seguida adicionou-se 75 µl de células de controlo ao poço de controlo e 75 µl de células de teste ao poço de teste. Após homogeneizar a incubação decorreu à temperatura ambiente, durante 60 min. Quando na amostra estavam presentes anticorpos anti-*Treponema pallidum* observou-se aglutinação que podia ter vários padrões, podendo ir desde um pequeno grupo de células aglutinadas envolvidas por um anel vermelho de células não aglutinadas, até todo o fundo do micropoço estar coberto de células aglutinadas - malha difusa. Nas amostras negativas não se visualizou aglutinação e os eritrócitos sedimentaram em forma de “botão” no fundo da microplaca. As amostras positivas foram quantificadas por diluições sucessivas de factor dois a partir da amostra diluída (1:80) utilizando as células de teste. O título considerado foi o da maior diluição na qual se verificou hemaglutinação. Quer no rastreio das amostras, quer na sua quantificação, foi sempre utilizado um controlo positivo e um controlo negativo. Todas as instruções laboratoriais cedidas pelo fornecedor foram seguidas na execução do teste.

Teste FTA-Abs - 'Fluorescent *Treponema* Antibody Absorbed'

O teste de imunofluorescência indirecta para a pesquisa de anticorpos IgG e IgM foi realizado com o 'kit' FTA-Abs IgG e FTA-Abs IgM da EUROIMMUN, em que o antígeno utilizado é uma suspensão de *Treponema pallidum* (estirpe de Nichols) fixada em lâminas. A reacção torna-se observável ao microscópio de fluorescência devido à junção de anticorpos anti-imunoglobulina M (anti-IgM) ou anti-imunoglobulina G (anti-IgG) humana marcada com fluoresceína, que se vão ligar ao complexo antígeno/anticorpo que se forma em caso de infecção por *Treponema pallidum*, resultando em espiroquetas fluorescentes de tonalidade esverdeada.

Inicialmente, procedeu-se a um pré-tratamento das amostras - absorção dos soros - onde se misturou 12,5 µl de amostra e 50 µl FTA - absorvente (diluição da amostra 1:5) que foram a incubar a 37°C, durante 30 min. Quando da pesquisa de anticorpos do tipo IgM, realizou-se uma imunoabsorção com o absorvente de factor reumatóide ('RF Absorbent') com o intuito de remover os anticorpos do tipo IgG do soro humano. Neste passo, adicionou-se 30 µl de amostra tratada com 30 µl de absorvente de factor reumatóide (diluição final da amostra 1:10) e incubou-se 15 min à temperatura ambiente. Posteriormente, centrifugou-se a 2000 rpm durante 5 min. Para a pesquisa de anticorpos IgG, diluiu-se a mistura em tampão fosfato salino (25 µl da amostra tratada e 25 µl de PBS Tween). Os restantes passos do protocolo foram semelhantes para os dois tipos de imunoglobulinas. De seguida, colocou-se a amostra diluída (25 µl) em contacto com o antígeno fixado na lâmina e incubou-se 30 min à temperatura ambiente. Após o período de incubação lavou-se a lâmina com um 'flush' de 'Phosphate Buffered Saline' com 'Tween' (PBS Tween) para remover os anticorpos não ligados e colocou-se a mesma dentro de um recipiente contendo PBS Tween durante 5 min, com agitação moderada. Às áreas de reacção adicionaram-se os anticorpos conjugados anti-IgG ou anti-IgM (20 µl), colocando sobre eles a lâmina que foi a incubar novamente durante 30 min. Após este período procedeu-se a nova lavagem com um 'flush' de PBS Tween e à imersão da lâmina em PBS Tween ao qual se adicionou 10 gotas de azul de Evans durante 5 min. Posteriormente, procedeu-se ao meio de montagem (10 µl PBS/glicerol por área de reacção da lamela) sobre o qual se colocou a lâmina. Por último, a lâmina foi observada ao microscópio de fluorescência com objectiva de 25X. Considerou-se um resultado positivo o que apresentou reactividade - presença de treponemas fluorescentes - e um resultado negativo o que não apresentou reactividade - ausência de fluorescência. Na execução do procedimento foi sempre incluído o controlo positivo e o controlo negativo, assegurando a correcta interpretação dos resultados. Ao longo de todo o protocolo experimental foram seguidas as indicações do fabricante.

2.3. Pesquisa de DNA de *Treponema pallidum*

Para a pesquisa de DNA de *Treponema pallidum*, tanto para a sua amplificação como para a sua subtipagem, tem de se extrair o DNA bacteriano existente nos diversos produtos biológicos. Assim sendo, o material genético da bactéria foi extraído de diversos tipos de amostras como sangue total, plasma, soro, liquor, exsudado de lesões cutâneas secundárias e exsudado de biopsia do lóbulo da orelha.

2.3.1. Extracção de DNA Total

Para a extracção do DNA foi utilizado o 'QIAamp® DNA Blood Mini Kit' da Quiagen, que permite uma rápida purificação do material genético a partir das amostras.

Na fase inicial do procedimento colocou-se 20 µl de proteinase K (40 µl para sangue total com EDTA ou soro) no fundo de um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, ao qual se adicionou de seguida 200 µl de amostra (400 µl de sangue total com EDTA ou soro). Posteriormente, juntou-se ao conteúdo do tubo 200 µl de tampão de lise (AL) (400 µl para sangue total com EDTA ou soro) e homogeneizou-se no vórtex durante 15 s. A mistura foi a incubar numa placa a 56°C, durante 30 min (para as amostras de sangue total com EDTA aumentou-se o tempo de incubação para 2 h). Devido à formação de água de condensação no interior da tampa do tubo foi necessário centrifugar alguns segundos o mesmo antes de adicionar à amostra clínica (excepto às amostras de sangue total com EDTA) 3 µl de DNA de timo de vitela - 'calf thymus' diluído a 1:10 - e 200 µl de etanol (400 µl para sangue total com EDTA ou soro), voltando a homogeneizar a mistura no vórtex durante 15 s. Após nova centrifugação rápida aplicou-se cuidadosamente a mistura à coluna ('Spin QIAamp') previamente inserida num tubo colector de 2 ml e centrifugou-se durante 1 min a 8000 rpm. Colocou-se então a coluna noutro tubo de recolha limpo, adicionou-se 500 µl de tampão de lavagem (AW1), sem molhar o bordo, e voltou-se a centrifugar a 8000 rpm durante 1 min (nas amostras de sangue total com EDTA esta lavagem deve ser repetida três vezes). Posteriormente, procedeu-se a uma segunda lavagem colocando 500 µl de tampão de lavagem (AW2) na coluna e a uma nova centrifugação a 13000 rpm durante 4 min (nas amostras de sangue total com EDTA esta lavagem deve ser repetida três vezes). Com o objectivo de remover totalmente o tampão AW2 efectuou-se uma centrifugação à velocidade máxima (13000 rpm) durante 1 min e de seguida, com a ajuda de uma micropipeta, removeu-se eventuais resíduos de tampão que pudessem ter ficado à volta do filtro da coluna. Em todos estes passos o tubo colector contendo o filtrado foi sempre trocado por um tubo de recolha limpo. O último conjunto de passos do protocolo foi a eluição do DNA das colunas com 80 µl de tampão de eluição (AE), incubação à temperatura ambiente durante

5 min e posterior centrifugação a 13000 rpm durante 1 min. No final procedeu-se à divisão do filtrado por dois 'eppendorfs' (40 µl em cada) que foram conservados a -20°C.

2.3.2. Amplificação de DNA de *Treponema pallidum* - PCR Diagnóstica

Para a amplificação do DNA foram utilizados 'primers' que têm como alvos de amplificação fragmentos do gene da lipoproteína da membrana de 47 kDa (fragmento de 260 bp), descrito por Orle *et al.* (1996) [36], e do gene da enzima DNA polimerase I (fragmento de 378 bp), descrito por Liu *et al.* (2001) [29] (Tabela Suplementar 1).

A utilização em simultâneo dos dois conjuntos de 'primers' foi denominada de técnica de PCR Multiplex e quando apenas se utilizou o conjunto de 'primers' KO3A-F/KO4-R a reacção foi chamada de técnica de PCR. Para cada um dos conjuntos de 'primers' foram estudadas diferentes concentrações de 'primers' e de cloreto de magnésio (MgCl₂) e modificações na temperatura de 'annealing' (TA). Para a optimização da técnica usou-se DNA previamente extraído de coelhos inoculados com *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (estirpe de Nichols) e, dos diversos ensaios realizados, foi seleccionado o que reuniu as melhores condições para a realização da técnica de PCR (Tabela Suplementar 2). As reacções de PCR foram realizadas nos termocicladores 'eppendorf® Mastercycler personal' e 'Biometra® Tpersonal' em tubos de 0,2 ml.

Mistura de Reacção

As misturas de reacção continham, para um volume total de 25 µl, tampão de PCR 1X [160 mM (NH₄)₂SO₄, 1 M Tris-HCl, pH 8,3 e 0,1% Tween-20], 2,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), 0,2 µM de cada 'primer' (ou somente 0,2 µM do par KO3A-F/KO4-R para a técnica de PCR) e 0,5 U da enzima DNA polimerase Immolase da Bioline. A cada tubo adicionou-se 5 µl de DNA correspondente a cada amostra.

Para a técnica de PCR Multiplex as amostras sofreram um ciclo de desnaturação inicial a 95°C durante 5 min e de seguida foram sujeitas a 45 ciclos de amplificação: desnaturação a 95°C durante 30 s, temperatura de 'annealing' a 62°C durante 30 s e extensão a 72°C durante 30 s; a etapa final de extensão foi a 72°C durante 15 min.

Para a técnica de PCR as amostras foram sujeitas a uma desnaturação inicial a 95°C durante 5 min e de seguida foram submetidas a 40 ciclos de amplificação: desnaturação a 94°C durante 20 s, temperatura de 'annealing' a 60°C durante 20 s e extensão a 72°C durante 20 s; a etapa final de extensão foi a 72°C durante 10 min. As amostras foram posteriormente conservadas a 4°C. Utilizou-se sempre controlos positivo e negativo que foram submetidos ao mesmo procedimento que as amostras de DNA.

Visualização do DNA

A amplificação do DNA das amostras foi visualizada após se ter realizado electroforese em gel de agarose a 1,5% à qual se adicionou brometo de etídio. A 10 µl dos produtos de PCR adicionaram-se 3 µl de azul de bromofenol, em parafilme, e colocaram-se nos poços do gel que foi submetido a um campo eléctrico de 100 V durante 1 h no aparelho 'Electrophoresis Power Supply (EPS) 301' da Amersham Pharmacia Biotech. Aplicou-se em todos os géis o marcador de massa molecular de '2 kb HyperLadder II' da Bioline, com o intuito de confirmar a massa molecular dos produtos obtidos.

As imagens dos produtos de amplificação da PCR foram captadas e fotografadas através do programa 'Quantity One 1-D Analysis Software' (versão 4.6.1.) da Bio-Rad.

2.3.3. Subtipagem Genómica de *Treponema pallidum*

Análise do Gene *tpr* por 'Nested' PCR-RFLP

Os 'primers' utilizados para a análise do gene *tpr* foram o B1-F e A2-R para a primeira amplificação - PCR 'Outer' - (fragmento de 2186 bp) e o IP6-F e IP7-R para a segunda amplificação - PCR 'Inner' - (fragmento de 1836 bp), tendo estes sido descritos por Pillay *et al.* (1998) [39] (Tabela Suplementar 1). A metodologia adoptada foi baseada na técnica desenvolvida pelos mesmos autores, sendo optimizadas algumas condições como as concentrações de 'primers' e de cloreto de magnésio e a temperatura de 'annealing' (Tabela Suplementar 3). Também neste procedimento foi utilizado DNA extraído de coelhos inoculados com *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (estirpe de Nichols) para a realização das diversas optimizações. Após se terem seleccionado as melhores condições, aplicou-se a 'nested' PCR às amostras positivas pela técnica da PCR diagnóstica, sendo realizada nos termocicladores 'epENDORF® Mastercycler personal' e 'Biometra® Tpersonal'.

Mistura de Reacção

A composição das misturas de reacção é idêntica para a primeira e para a segunda amplificação, com a excepção dos 'primers' utilizados. Deste modo, estas contêm tampão de PCR 1X [160 mM (NH₄)₂SO₄, 1 M Tris-HCl, pH 8,3 e 0,1% Tween-20], 3 mM de MgCl₂, 1 mM de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), 0,6 µM dos 'primers' B1-F/A2-R ou 0,2 µM dos 'primers' IP6-F/IP7-R e 1,25 U da enzima DNA polimerase Immolase da Bioline. À semelhança da PCR diagnóstica, as misturas de reacção foram distribuídas por tubos de 0,2 ml, aos quais se adicionaram 5 µl de DNA das amostras para a primeira amplificação e 1 µl do produto do PCR 'Outer' para a realização da segunda amplificação.

Para a primeira amplificação, as amostras foram sujeitas a uma fase inicial de desnaturação a 95°C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de amplificação: desnaturação a 94°C durante 1 min, hibridação dos 'primers' a 59°C durante 2 min e extensão a 72°C durante 2 min; a extensão final foi a 72°C durante 15 min.

Para a segunda amplificação foram aplicadas as seguintes condições: fase inicial de desnaturação a 95°C durante 5 min, seguida de 40 ciclos de amplificação: desnaturação a 94°C durante 1 min, hibridação dos 'primers' a 62°C durante 1 min e extensão a 72°C durante 1 min; a extensão final foi a 72°C durante 10 min. Posteriormente, as amostras foram mantidas a 4°C.

Igualmente foram utilizados controlos positivo e negativo, sujeitos às mesmas condições das amostras de DNA e dos produtos do PCR 'Outer'.

Visualização do DNA

Os produtos da amplificação foram visualizados de maneira semelhante à descrita para a técnica de PCR diagnóstica, embora com duas diferenças: a electroforese decorreu durante 1 h e 15 min e o marcador de massa molecular utilizado foi o 'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder' da Fermentas.

Análise de Restrição dos Produtos de Amplificação do Gene *tp* - RFLP

Após algumas optimizações (Tabela Suplementar 4), os produtos da técnica de PCR 'Inner' foram estudados através da técnica de RFLP, recorrendo ao auxílio da enzima *Mse* I da Invitrogen. A mistura de restrição para a realização da técnica continha 2,49 µl de tampão da enzima 1,66X, 4,15 U de *Mse* I e 10 µl de produto de PCR 'Inner' totalizando um volume de 15 µl. Posteriormente, os tubos contendo a mistura de digestão foram a incubar numa placa a 37°C, 'overnight'. Para a separação dos fragmentos de restrição, a mistura foi sujeita a electroforese em gel de agarose a 1,5% durante 1 h e 20 min a 100 V. O 'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder' da Fermentas foi o marcador de massa molecular utilizado para a análise dos fragmentos de restrição obtidos, que foram visualizados e fotografados pelo aparelho da Bio-Rad utilizando o programa 'Quantity One 1-D Analysis Software' (versão 4.6.1.).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Pesquisa de Anticorpos Anti-*Treponema pallidum* no Sangue

3.1.1. Análise Geral

Estudou-se um total de 409 soros, nos quais foram executados os testes serológicos para o diagnóstico de sífilis - um teste não específico (RPR) para rastreio e um teste específico (TPHA) para confirmação do diagnóstico. O RPR foi reactivo em 17,9% e não reactivo em 82,2%, tendo, por sua vez, o TPHA exibido reactividade em 24,5% e encontrando-se esta ausente em 75,6% (Tabela 2).

Tabela 2. Reactividade dos soros estudados obtida com os testes RPR e TPHA.

RPR		TPHA	
Não Reactivos	Reactivos	Não Reactivos	Reactivos
336/409 (82,2%)	73/409 (17,9%)	309/409 (75,6%)	100/409 (24,5%)
Total: 409 (100%)			

Comparados os dois tipos de testes verificou-se que 74,8% (306/409) das amostras não apresentaram reactividade em nenhuma das técnicas utilizadas e tendo esta existido, em ambos os testes, em 17,1% (70/409). Salienta-se que em 0,7% (3/409) das amostras se obtiveram resultados reactivos só para a técnica de RPR e em 7,3% (30/409) para a técnica de TPHA (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação da reactividade obtida (409 soros) com os testes RPR e TPHA.

		TPHA		Total
		Não Reactivo	Reactivo	
RPR	Não Reactivo	306 (74,8%)	30 (7,3%)	336 (82,2%)
	Reactivo	3 (0,7%)	70 (17,1%)	73 (17,9%)
	Total	309 (75,6%)	100 (24,5%)	409 (100%)

3.1.2. Comparação dos Testes Serológicos

Após se ter realizado o rastreio dos 409 soros com a técnica de RPR e de se ter confirmado o resultado com a técnica de TPHA, nos soros em que se obteve reactividade num dos testes ou em ambos (103 soros), foram ainda executados os testes VDRL (não específico) e FTA-Abs (específico) com o objectivo de comparar os testes não treponémicos entre si e, do mesmo modo, comparar os testes treponémicos.

Para avaliar a sensibilidade e a especificidade dos testes em estudo e, sendo o FTA-Abs-G considerado como técnica padrão, estudou-se um número igual de soros (103) com resultados negativos.

Testes Não Treponémicos

Estudou-se a reactividade dos testes não treponémicos em 206 soros, tendo o RPR sido reactivo em 35,4% (73/206) e não reactivo em 64,6% (133/206); no entanto, o VDRL apresentou reactividade em 36,9% (76/206), não a tendo demonstrado em 63,1% (130/206).

Quando se compararam os resultados obtidos verificou-se que 35,4% (73/206) eram reactivos tanto para o teste de RPR como para o de VDRL, não reactivos em 63,1% (130/206) para ambos os testes e que apenas 1,5% (3/206) demonstraram reactividade somente na técnica de VDRL. Com base nestes dados verificou-se que o VDRL apresenta uma maior reactividade do que a técnica de RPR. A taxa de concordância entre os testes não específicos foi de 98,5%, o que evidencia que os dois testes são semelhantes embora o significado real destes resultados necessitasse do isolamento de *Treponema pallidum* (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação da reactividade obtida (206 soros) com os testes RPR e VDRL.

		VDRL		Total
		Não Reactivo	Reactivo	
RPR	Não Reactivo	130 (63,1%)	3 (1,5%)	133 (64,6%)
	Reactivo	0 (0%)	73 (35,4%)	73 (35,4%)
	Total	130 (63,1%)	76 (36,9%)	206 (100%)

Testes Treponémicos

A reactividade dos testes treponémicos foi avaliada nos mesmos 206 soros, dos quais o teste de TPHA demonstrou reactividade em 48,5% (100/206), não a manifestando em 51,5% (106/206). No caso do teste de FTA-Abs, este foi reactivo em 47,6% (98/206) e não reactivo em 52,4% (108/206).

Avaliando os testes treponémicos em simultâneo, constatou-se que 46,6% (96/206) eram reactivos para ambos testes, e que 50,5% (104/206) não eram reactivos para os dois testes. Por sua vez, 1,9% (4/206) foram reactivos apenas para a técnica de TPHA e 1,0% (2/206) reactivos só para o teste FTA-Abs. Embora a reactividade do teste de TPHA em relação ao FTA-Abs seja também maior, a taxa de concordância entre os testes específicos é bastante semelhante (97,1%). Tal como foi mencionado para os testes não treponémicos o seu verdadeiro significado teria de basear-se na identificação de *Treponema pallidum* (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação da reactividade obtida (206 soros) com os testes TPHA e FTA-Abs.

		FTA-Abs		Total
		Não Reactivo	Reactivo	
TPHA	Não Reactivo	104 (50,5%)	2 (1,0%)	106 (51,5%)
	Reactivo	4 (1,9%)	96 (46,6%)	100 (48,5%)
	Total	108 (52,4%)	98 (47,6%)	206 (100%)

3.1.3. Estudo da Sensibilidade e Especificidade dos Testes Serológicos

Um dos objectivos do presente trabalho foi avaliar a sensibilidade e a especificidade dos testes não treponémicos - RPR e VDRL - e do teste treponémico TPHA. Para este tipo de análise usa-se geralmente um teste considerado o 'gold standard' que serve de referência e com o qual todos os outros testes de diagnóstico irão ser comparados. No entanto, devido à complexidade de *Treponema pallidum* (microrganismo fastidioso que não é cultivável *in vitro*) não existe um teste 'gold standard' que possa ser utilizado para o diagnóstico definitivo de sífilis. Deste modo, a técnica de FTA-Abs-G é geralmente utilizada como teste padrão por reunir, de um modo geral, as melhores condições de sensibilidade e de especificidade [5, 47]. Em estudos anteriormente efectuados ficou demonstrado que a sua sensibilidade é de 70 a 100% em infecções recentes [5, 11, 20], de 100% em situações de sífilis secundária e de 96 a 100% nos casos de sífilis tardia; a especificidade do teste oscila entre os 92 a 99% [5].

Sensibilidade e Especificidade dos Testes RPR e VDRL

Após se ter realizado a comparação dos testes não treponémicos com o teste FTA-Abs-G verificou-se que a sensibilidade do RPR foi de 71,4% (70/98) e que a do VDRL foi de 74,5% (73/98), apresentando ambos os testes sensibilidades semelhantes (Tabelas 6 e 7). Tal facto, está de acordo com a literatura [3, 5, 26, 47], embora em estudos anteriores [26, 47] a sensibilidade do RPR tenha sido ligeiramente superior à do VDRL. Assim em indivíduos com sífilis primária a sensibilidade do RPR foi cerca de 86%, 100% na sífilis secundária, 98% na sífilis latente e 73% na sífilis tardia. Já o VDRL apresentou uma sensibilidade de 78%, 100%, 95% e 71%, respectivamente, na sífilis primária, secundária, latente e tardia [3, 5, 26, 47]. Deste modo, verifica-se que os testes não treponémicos são mais sensíveis na fase secundária e latente da doença do que na fase primária, uma vez que no início da doença os testes podem ainda não ser reactivos e na fase de sífilis tardia podem já não ser reactivos [2, 11].

Relativamente à especificidade esta foi igual no RPR e no VDRL, sendo o seu valor de 97,2% (105/108), valor muito próximo ao descrito noutros estudos onde a especificidade para ambos os testes é de 98% [3, 5, 26, 47].

Tabela 6. Sensibilidade e especificidade do teste RPR em comparação com o teste FTA-Abs-G.

		FTA-Abs-G		Total
		Não Reactivo	Reactivo	
RPR	Não Reactivo	105	28	133
	Reactivo	3	70	73
	Total	108	98	206

Tabela 7. Sensibilidade e especificidade do teste VDRL em comparação com o teste FTA-Abs-G.

		FTA-Abs-G		Total
		Não Reactivo	Reactivo	
VDRL	Não Reactivo	105	25	130
	Reactivo	3	73	76
	Total	108	98	206

Sensibilidade e Especificidade do Teste TPHA

Quando comparado o teste treponémico TPHA com o teste treponémico FTA-Abs-G para o cálculo da sensibilidade e da especificidade, constatou-se que o primeiro parâmetro apresentava um valor de 98,0% (96/98) e o segundo de 96,3% (104/108) (Tabela 8).

Em relação à sensibilidade da técnica de TPHA o valor determinado está de acordo com outros estudos, uma vez que ronda os 69 a 90% nos casos de sífilis primária, 100% na sífilis secundária, 97 a 100% em situações de sífilis latente e 94% se fôr no estágio tardio. No que diz respeito à especificidade o valor calculado neste estudo foi um pouco menor que os valores citados em alguns trabalhos (98 a 100%) [3, 5].

Tabela 8. Sensibilidade e especificidade do teste TPHA em comparação com o teste FTA-Abs-G.

		FTA-Abs-G		Total
		Não Reactivo	Reactivo	
TPHA	Não Reactivo	104	2	106
	Reactivo	4	96	100
	Total	108	98	206

3.1.4. Testes Serológicos - Padrão de Infecção

Depois de se ter realizado o estudo da sensibilidade e especificidade dos testes serológicos no universo dos 206 soros, analisaram-se os diferentes padrões serológicos obtidos com o objectivo de inferir um possível padrão de infecção dos indivíduos. É de salientar que a história clínica e sexual dos mesmos, a que neste estudo não tivemos acesso, é de extrema importância para o diagnóstico, atendendo a que este deve basear-se na ligação entre os dados clínicos e os resultados laboratoriais.

As diferentes combinações serológicas possíveis deram origem a 16 padrões diferentes. Os resultados obtidos permitiram classificar os indivíduos incluídos neste estudo em 8 dos 16 padrões possíveis quando se efectuaram dois testes específicos e dois testes não específicos para a pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum*. Deste modo, 33,0% (68/206) obtiveram reactividade em todos os testes, 12,1% (25/206) manifestaram reactividade apenas nos testes treponémicos, 1,5% (3/206) apresentaram reactividade nos testes VDRL, TPHA e FTA-Abs, 1,0% (2/206) exibiram reactividade nos testes RPR, VDRL e FTA-Abs, 1,0% (2/206) foram reactivos nos testes RPR, VDRL e TPHA, 1,0% (2/206) demonstraram reactividade somente no TPHA, 0,5% (1/206) foi apenas reactivo para os testes não treponémicos e 50,0% (103/206) não apresentaram reactividade em nenhum dos testes (Tabela 9).

Tabela 9. Número de casos de acordo com as diferentes combinações serológicas possíveis com os quatros tipos de testes utilizados neste estudo.

	Testes Serológicos				Número de Casos	População
	RPR	VDRL	TPHA	FTA-Abs		
Padrões Serológicos	R	R	R	R	68	H(66) C(2)
	NR	NR	R	R	25	H(22) C(3)
	NR	R	R	R	3	H(2) C(1)
	R	R	NR	R	2	H(2)
	R	R	R	NR	2	H(2)
	NR	NR	R	NR	2	H(1) C(1)
	R	R	NR	NR	1	H(1)
	NR	NR	NR	NR	103	H(15) C(8) U(80)
	R	NR	NR	NR	0	
	NR	R	NR	NR	0	
	R	NR	R	NR	0	
	NR	R	R	NR	0	
	NR	NR	NR	R	0	
	R	NR	NR	R	0	
	NR	R	NR	R	0	
	R	NR	R	R	0	
Total:					206	

(R - Reactivo; NR - Não reactivo)

(H - Hospitais; C - CAOMIO; U - Universidades)

Os 68 casos em que todos os testes foram reactivos corresponderão, possivelmente, a indivíduos com sífilis activa e portanto não tratada, podendo ser sífilis primária, secundária ou latente, considerando que todos os testes deverão ser reactivos em qualquer destas fases da doença [2, 31, 47]. Analisando os títulos, tanto do RPR, como do TPHA, pensa-se que 46/68 sejam casos de sífilis primária pois os títulos são relativamente baixos [5], oscilando entre 1:2 e 1:16 no caso do RPR e entre 1:80 e 1:20480 no caso do TPHA. No entanto, as menores diluições poderão também corresponder a sífilis tratada, não tendo decorrido tempo suficiente para deixar de existir reactividade nos soros desses doentes [2]. Por sua vez, 22/68 poderão corresponder a casos de sífilis primária ou secundária com maior possibilidade para esta última devido aos títulos do RPR e do TPHA serem elevados [2], rondando estes entre 1:32 e 1:2048 no RPR e entre 1:1280 e 1:1310720 no TPHA. Destaca-se que em dois destes 22 casos havia informação clínica sobre a existência de lesões cutâneas secundárias, nos soros dos quais a titulação do teste de RPR foi de 1:32 e do teste de TPHA de 1:10240 para um deles, e de 1:64 e de 1:81920, respectivamente, para o outro. Esta situação parece, mais uma vez, confirmar que no estágio secundário os títulos de anticorpos anti-*Treponema pallidum* são sempre iguais ou maiores do que 1:32 e as titulações do TPHA sempre muito elevadas.

No caso dos 25 indivíduos em que os testes não treponémicos foram não reactivos e os testes treponémicos reactivos, o mais provável é corresponderem a casos de sífilis tratada [2, 47]. Tal suposição baseia-se no facto da maior parte dos testes não treponémicos

acabarem por se tornar não reactivos um ano após terapêutica correcta da sífilis primária, e após dois anos nos casos de sífilis secundária [5]. Muitos desses indivíduos não se lembram de terem tido sífilis e de terem sido tratados, pois a sua lesão passou despercebida e curou devido a um antibiótico administrado para outra infecção que não sífilis [5]. No que diz respeito aos testes treponémicos, estes podem permanecer reactivos durante toda a vida, mesmo após terapêutica adequada [2, 5, 11].

Os três casos em que o teste RPR é não reactivo e os testes VDRL, TPHA e FTA-Abs são reactivos, provavelmente, corresponderão a situações de sífilis recente nas quais o teste de RPR se comporta como falso negativo, já que os outros três testes são reactivos (um não específico e dois específicos). Outra hipótese é a de corresponderem a casos de sífilis latente tardia, na qual os testes não treponémicos podem não apresentar reactividade, enquanto que os testes treponémicos se podem manter reactivos [2, 11, 47]. Um facto um pouco incoerente é o VDRL ser reactivo, pois deveria apresentar um padrão de reactividade semelhante ao RPR. No entanto, o VDRL em dois dos casos foi apenas reactivo na diluição de 1:1 e no outro apresentou um título de 1:2. Assim, estes casos podem corresponder também a sífilis tratada [2, 47], sendo que o VDRL ainda não deixou de ser reactivo embora com diluições mínimas.

Em dois casos o TPHA foi reactivo e os restantes testes não reactivos, enquanto noutros dois casos o cenário foi o oposto, o TPHA não reactivo e os outros testes reactivos. Os dois primeiros casos poderão resultar de falsos positivos deste teste específico. Geralmente, no TPHA este tipo de resultados são inferiores a 1%, podendo ocorrer em doentes com mononucleose infecciosa, com doenças de colagénio, lepra e em toxicodependentes [5]. Uma vez que a sífilis pode coexistir com estas patologias a diferenciação dos resultados pode tornar-se bastante difícil, embora em casos raros. Os outros dois casos, por sua vez, parecem estar relacionados com falsos negativos para o teste TPHA.

Destacaram-se dois casos em que o FTA-Abs foi não reactivo e os restantes testes reactivos, levando a crer que os resultados serão também falsos negativos. Tanto no caso do TPHA como do FTA-Abs, os falsos negativos podem dever-se a um erro laboratorial relacionado com a pipetagem, com os reagentes ou mesmo com a microplaca no caso do TPHA ou lâmina no caso do FTA-Abs [5]. Outra hipótese é a descida de títulos pós-terapêutica, porque as titulações dos outros testes são extremamente baixas. A maioria dos resultados de falsos positivos com o teste de FTA-Abs estão associados a doenças do sistema conjuntivo, a doentes com anemia hemolítica auto-imune e à gravidez [5], mas neste estudo não se obteve nenhum caso de falsa reactividade.

Existiu ainda uma amostra em que os testes não treponémicos foram reactivos e os treponémicos não reactivos. Geralmente, este resultado corresponde a uma reacção de

falsa reactividade por parte dos testes não treponémicos, sendo por isso considerados falsos positivos [47], uma vez que as diluições dos testes não treponémicos são de 1:8, correspondendo a um título 'borderline' que tem sempre de ser confirmado [2].

Os restantes 103 indivíduos em que os respectivos soros foram não reactivos para todos os testes foram considerados como nunca tendo tido sífilis.

Relativamente à população avaliada com base nos quatro tipos de testes serológicos, verifica-se que a maior parte dos indivíduos dos hospitais e do CAOMIO são os que têm, pelo menos, um dos testes reactivo. Isto deve-se, eventualmente, ao facto de serem indivíduos com suspeita de sífilis, no caso das amostras dos hospitais, ou indivíduos considerados como grupo de risco, no caso das amostras do CAOMIO. Os restantes indivíduos, em que os quatro tipos de testes foram todos não reactivos, pertencem a qualquer um dos três locais de recolha. No entanto, o maior número de casos está relacionado com indivíduos das universidades, talvez por estes estarem mais informados e por conseguinte apresentando menos comportamentos de risco.

3.2. Pesquisa de Anticorpos Anti-*Treponema pallidum* no Liquor

À semelhança dos soros, os líquidos dos indivíduos com suspeita de neurosífilis foram analisados pelo teste não treponémico RPR que parece ter uma sensibilidade e especificidade semelhantes ao teste de VDRL no liquor (sensibilidade de 75% e especificidade de 99,3%) [9] e pelo teste treponémico TPHA. A reactividade dos testes foi avaliada em 18 líquidos provenientes do Hospital de Egas Moniz.

Da análise dos resultados obtidos com os dois testes, 88,9% (16/18) não apresentaram reactividade nem no RPR nem no TPHA, pelo que se excluiu o diagnóstico de neurosífilis. No entanto, 5,6% (1/18) demonstrou reactividade em ambos os testes, com RPR reactivo para a diluição de 1:1 e TPHA com um título de 1:640 e 5,6% (1/18) apenas foi reactivo para TPHA, sendo o seu título de 1:160 (Tabela 10). Nestes dois líquidos, devido a terem apresentado reactividade em pelo menos um teste, foi realizado o teste FTA-Abs. Sabe-se que, ao contrário do soro, o FTA-Abs apresenta uma maior sensibilidade (97,7 a 100%) [5, 6, 27, 32], pelo que a não reactividade do FTA-Abs exclui o diagnóstico de neurosífilis [5, 6, 14].

Em ambos os casos o FTA-Abs foi reactivo, tendo o primeiro caso sido diagnosticado como neurosífilis e o segundo considerado, possivelmente, um falso positivo, na medida em que o TPHA no liquor não é tão específico como o RPR [5], podendo ter existido contaminação com sangue, na altura da colheita do liquor [5], principalmente se for tido em conta que a concentração de anticorpos no soro foi muito elevada (RPR reactivo para 1:128 e TPHA reactivo para 1:40860).

Tabela 10. Comparação da reactividade obtida (18 líquidos) com os testes RPR e TPHA.

		TPHA		Total
		Não Reactivo	Reactivo	
RPR	Não Reactivo	16 (88,9%)	1 (5,6%)	17 (94,4%)
	Reactivo	0 (0%)	1 (5,6%)	1 (5,6%)
	Total	16 (88,9%)	2 (11,1%)	18 (100%)

3.3. Pesquisa de DNA de *Treponema pallidum*

3.3.1. Amplificação de DNA de *Treponema pallidum* - PCR Diagnóstica

Realizou-se a pesquisa de DNA de *Treponema pallidum* num total de 90 amostras provenientes do Hospital Distrital de Santarém (27), do Hospital de Santa Maria (56) e do Hospital de Egas Moniz (7), por serem amostras de indivíduos infectados ou com suspeita de sífilis e tendo os respectivos soros sido reactivos para as técnicas de RPR e TPHA.

Apenas a partir de 6,7% (6/90) das amostras foi possível obter amplificação de DNA bacteriano de *Treponema pallidum* pela técnica de PCR com os 'primers' KO3A/KO4. Nas amostras, cinco de soro e uma de LCR, observou-se uma banda de DNA - correspondente ao fragmento do gene da lipoproteína de 47 kDa - de 260 bp tal como a obtida no controlo positivo (DNA de *Treponema pallidum* estirpe de Nichols) (Figura 1).

No entanto, pela técnica de PCR Multiplex não se detectou DNA de *Treponema pallidum* em nenhuma das 90 amostras clínicas, apesar de se ter realizado várias optimizações.

Deste modo, quando comparadas as duas técnicas entre si, a técnica de PCR KO3A/KO4 parece funcionar de um modo muito mais eficaz. O facto de a técnica utilizar apenas um par de 'primers' parece conferir determinadas vantagens, uma vez que diminui a competição dos 'primers' pelo DNA e porque facilita, em larga escala, as optimizações relativamente à mistura de reacção e condições de amplificação.

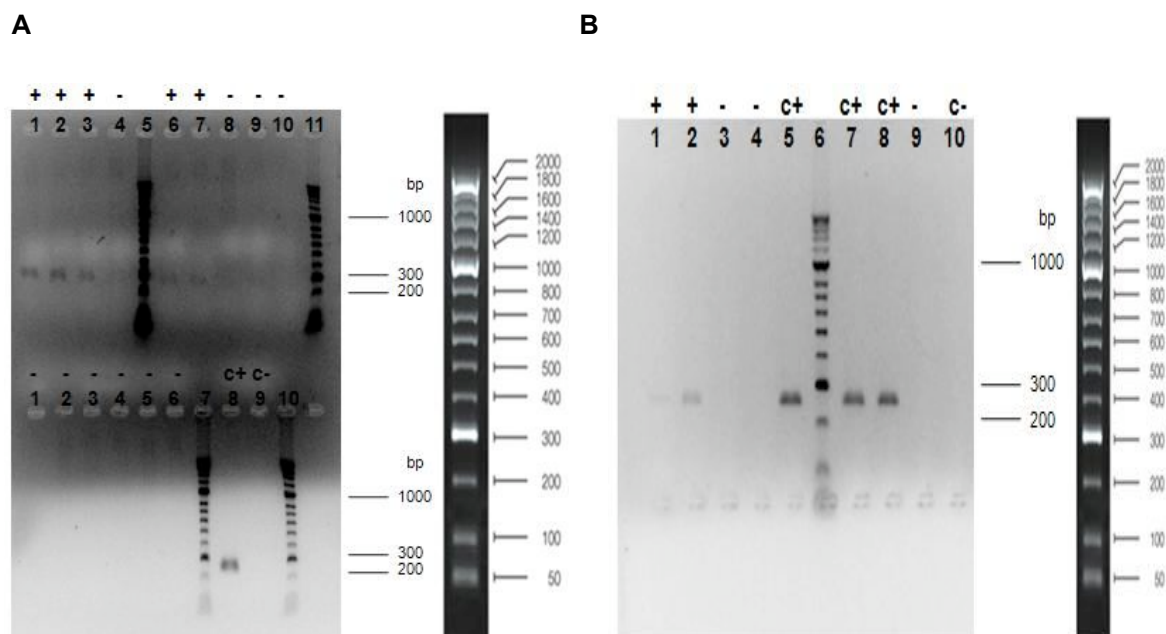


Figura 1. (A) Visualização em gel de agarose dos produtos amplificados a partir de DNA extraído das amostras de soros pela técnica de PCR. Pente superior: poços 1 a 3, 6 e 7 - produtos amplificados; poços 4, 8 a 10 - produtos não amplificados e poços 5 e 11 - marcador de massa molecular '2 kb HyperLadder II'. Pente inferior: poços 1 a 6 - produtos não amplificados; poços 7 e 10 - marcador de massa molecular '2 kb HyperLadder II'; poço 8 - controlo positivo e poço 9 - controlo negativo.

(B) Visualização em gel de agarose dos produtos amplificados a partir de DNA extraído da amostra de LCR pela técnica de PCR. Poços 1 e 2 - produtos amplificados (5 µl DNA e 2,5 µl DNA, respectivamente); poços 3, 4, e 9 - produtos não amplificados; poços 5, 7 e 8 - controlos positivos; poço 6 - marcador de massa molecular '2 kb HyperLadder II' e poço 10 - controlo negativo.

3.3.2. Subtipagem Genómica de *Treponema pallidum* - 'Nested' PCR

As seis amostras que apresentaram amplificação do fragmento do gene da lipoproteína de 47 kDa na PCR diagnóstica foram subtipadas através da técnica de 'nested' PCR-RFLP.

Na primeira amplificação (PCR 'Outer') com o par de 'primers' B1/A2 esperava obter-se um fragmento de 2186 bp [39]. No entanto, por visualização do gel de agarose verificou-se, tanto nas seis amostras clínicas como nos dois controlos positivos, a existência de várias bandas com massas moleculares compreendidas entre os 500 e os 1500 bp, o que demonstra, provavelmente, uma certa inespecificidade dos 'primers' utilizados (Figura 2).

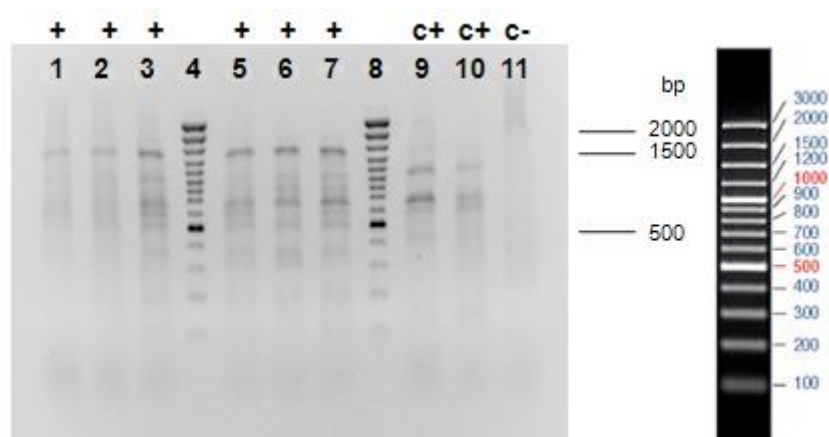


Figura 2. Visualização em gel de agarose dos produtos amplificados pela técnica de PCR 'Outer'. Poços 1 a 3 e 5 a 7 - produtos amplificados; poços 4 e 8 - marcador de massa molecular 'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder'; poços 9 e 10 - controlos positivos e poço 11 - controlo negativo.

Na segunda amplificação (PCR 'Inner'), o fragmento esperado, utilizando o par de 'primers' IP6/IP7, deveria ter 1836 bp [39]. No entanto, em apenas uma das amostras e nos controlos positivos (DNA de *Treponema pallidum* estirpe de Nichols) uma banda de 2000 bp, ou seja, com massa molecular superior, foi observada (Figura 3).

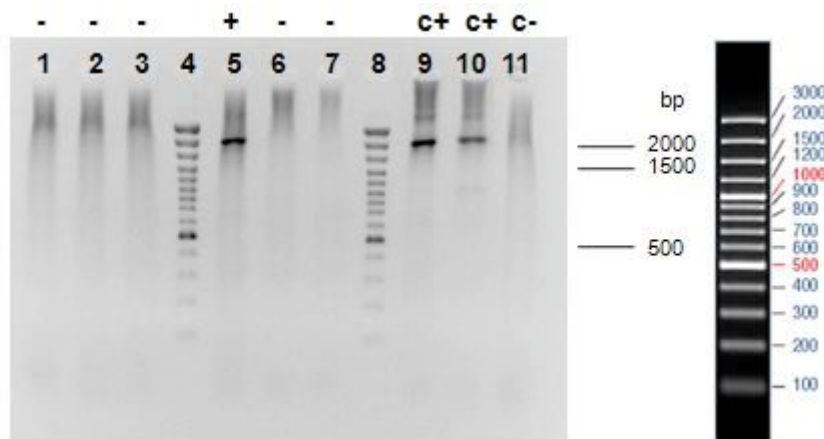


Figura 3. Visualização em gel de agarose dos produtos amplificados pela técnica de PCR 'Inner'. Poços 1 a 3, 6 e 7 - produtos não amplificados; poços 4 e 8 - marcador de massa molecular 'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder'; poço 5 - produto amplificado; poços 9 e 10 - controlos positivos e poço 11 - controlo negativo.

A técnica de 'nested' PCR tem como objectivo aumentar a especificidade do método de detecção. Assim, é muito frequente que os produtos do PCR 'Outer' não se consigam visualizar em gel, embora tenha existido amplificação de DNA, ou então apresentem inespecificidades exibindo várias bandas além da esperada. No entanto, os produtos do PCR 'Inner', por norma, não apresentam tantas inespecificidades, pelo que a banda

amplificada se apresenta de um modo bastante visível e nítido no gel. Uma hipótese possível para tentar solucionar o problema da inespecificidade será elevar a temperatura de ‘annealing’, aumentando a especificidade da reacção.

Os produtos resultantes da única amostra amplificada pela técnica de ‘nested’ PCR ‘Inner’, assim como dos controlos positivos, foram submetidos a uma análise de restrição com a enzima *Mse* I, com o intuito de determinar quais os subtipos de *Treponema pallidum* existentes [13].

Por observação do gel verificou-se a existência de duas bandas de DNA, uma com dimensão um pouco superior a 400 bp e outra de 1000 bp, correspondentes à amostra clínica. Por sua vez, no controlo positivo observaram-se cinco fragmentos de DNA que devem corresponder ao subtipo a descrito por Pillay *et al.* (1998) [39] (382, 425, 524, 722 e 911 bp) (Figura 4).

De notar que o padrão de RFLP do DNA existente no soro deste doente não foi semelhante a nenhum dos 13 subtipos identificados e descritos pelo mesmo autor.

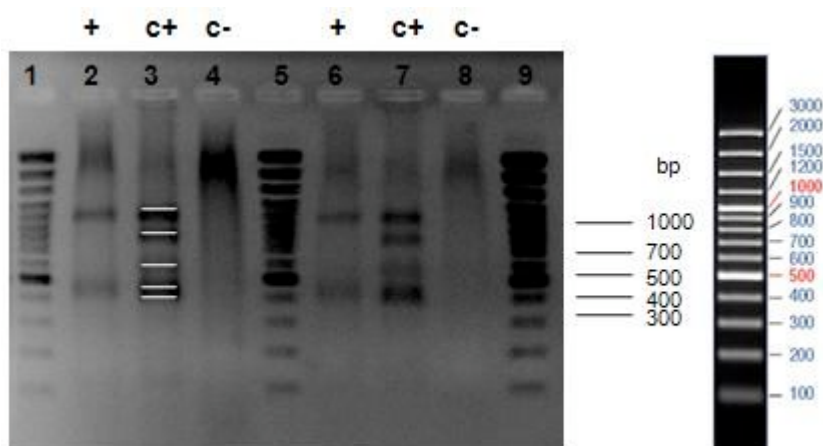


Figura 4. Visualização em gel de agarose dos padrões de RFLP obtidos com a enzima de restrição *Mse* I aplicada aos produtos de ‘nested’ PCR do DNA de *Treponema pallidum* existente numa amostra clínica e no controlo positivo. Poços 1,5 e 9 - marcador de massa molecular ‘GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder’; poços 2 e 6 - produtos amplificados; poços 3 e 7 - controlo positivo e poços 4 e 8 - controlo negativo. Amostras 2 a 4 - 10 µl de produto de PCR ‘Inner’ na mistura de digestão e amostras 6 a 8 - 5 µl de produto de PCR ‘Inner’ na mistura de digestão.

3.3.3. Testes Serológicos versus Técnicas Moleculares

Das 90 amostras, com pelo menos um teste específico e um não específico reactivo, apenas se conseguiu amplificar 6,7% (6/90) através da técnica de PCR diagnóstica, e destas apenas foi possível subtipar pela técnica de ‘nested’ PCR 1,1% (1/6) (Tabela 11).

Apesar do número de amostras estudadas não ser muito elevado, o número de amostras positivas obtidas por ambas as técnicas foi baixo tendo em conta que a maioria

das amostras analisadas, nesta parte do estudo, eram provenientes de indivíduos com uma forte suspeita de sífilis e com serologias muito elevadas.

Tabela 11. Resultados serológicos e moleculares das amostras amplificadas pela técnica de PCR diagnóstica.

Doente	Produto	Testes Serológicos Não Treponémicos		Testes Serológicos Treponémicos		Técnicas Moleculares	
		RPR	VDRL	TPHA	FTA-Abs	PCR Diagnóstica	'Nested' PCR
1	Soro	Reactivo (1:8)	Reactivo (1:8)	Reactivo (1:2560)	Reactivo	Pos.	Neg.
2	Soro	Reactivo (1:2)	Reactivo (1:2)	Reactivo (1:2560)	Reactivo	Pos.	Neg.
3	Soro	Reactivo (1:8)	Reactivo (1:8)	Reactivo (1:640)	Reactivo	Pos.	Neg.
4	Soro	Reactivo (1:2)	Reactivo (1:2)	Reactivo (1:2560)	Reactivo	Pos.	Pos.
5	Soro	Reactivo (1:32)	Reactivo (1:32)	Reactivo (1:10240)	Reactivo	Pos.	Neg.
6	LCR	Reactivo (1:1)	Reactivo (1:1)	Reactivo (1:640)	Reactivo	Pos.	Neg.

(Pos. - Positivo; Neg. - Negativo)

Alguns factores podem ter contribuído para este cenário, como o tipo de amostra e a fase da doença. Alguns autores defendem que o exsudado de úlcera, o exsudado de lesão e o exsudado de biopsia do lóbulo da orelha parecem ser o tipo de amostras com as quais se obtêm melhores resultados nas técnicas de PCR, quando comparadas com as amostras de sangue [5, 7, 8, 19, 36, 39, 50].

No que diz respeito às técnicas de PCR-*Tp47*, PCR-*poIA* e PCR-Multiplex, a percentagem de positividade para as três técnicas é de 100% para exsudado de úlcera e de 66,7% para o exsudado de lesão [5]. Para o exsudado de biopsia do lóbulo da orelha, a positividade é de 57,1 a 61,5% para a técnica de PCR-*Tp47*, de 53,8 a 59% para a técnica de PCR-*poIA* e de 56,4 a 57,1% para PCR-Multiplex [5, 8].

No entanto, para o sistema de subtipagem utilizando o estudo dos genes *arp* e *tpr*, a percentagem de positividade é de 54,2 a 100% para exsudado de úlcera [5, 7, 39, 50], de 64,3 a 100% para o exsudado de lesão [5, 7, 19] e de 59,1 a 76,2% para o exsudado de biopsia do lóbulo da orelha [5, 7].

Tais factos são em grande parte justificados, pois sabe-se que na infecção por *Treponema pallidum* a espiroquetémia é de maior intensidade na sífilis secundária, seguida da fase primária.

Quando se trata de amostras de sangue, plasma, soro ou liquor as respectivas percentagens de positividade das técnicas de PCR são mais baixas, talvez pelo facto destas

amostras clínicas, essencialmente os soros, poderem possuir compostos que inibam as reacções de amplificação [5, 7, 8, 19, 50].

Deste modo, para amostras de plasma, a percentagem de positividade para as técnicas de PCR-*Tp47*, PCR-*poIA* e PCR-Multiplex é de 44,9 a 51,6%, de 36,2 a 44% e de 36,3 a 42%, respectivamente. Para o sangue, a positividade é de 39,1 a 45,1% para a técnica de PCR-*Tp47*, de 27,5 a 34,1% para a técnica de PCR-*poIA* e de 31,9 a 37,7% para a técnica de PCR-Multiplex. Nas amostras de soro, as técnicas de PCR-*Tp47*, PCR-*poIA* e PCR-Multiplex apresentam uma percentagem de positividade de 26,1 a 28,9%, de 20,3 a 22,8% e de 17,5 a 27,5%, respectivamente [5, 8]. No entanto, existem outros investigadores que mostram que a percentagem de positividade é de 58 a 75% para o soro, de 68 a 91% para o plasma e de 41% para o sangue [49].

Por sua vez, no sistema de subtipagem, a percentagem de positividade é de 27 a 59,1% para o sangue [5, 7, 19, 50], de 46,2 a 62,5% para o plasma [5, 7] e de 11,5% para o soro [5].

Sabe-se que o soro costuma apresentar maus resultados nas técnicas de biologia molecular, talvez pelo facto de os microrganismos ficarem aprisionados no coágulo [5]. No entanto, no presente estudo utilizou-se sangue, liquor e principalmente soro, que são exactamente os tipos de produtos biológicos com menor número de amostras positivas, como se pode observar pelos vários estudos realizados e pelos resultados obtidos (6,7%).

Tendo em vista o padrão de RFLP obtido com a única amostra que se conseguiu subtipar poder-se-á estar perante um subtipo nunca antes descrito cuja confirmação só poderá ser efectuada por sequenciação.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A complexidade da doença e as dificuldades e limitações existentes no diagnóstico clínico e laboratorial da sífilis vêm suportar a ideia de que ainda existe muito a fazer sobre o diagnóstico laboratorial desta doença. Prova disso são os inúmeros e variados estudos que têm vindo a ser efectuados com o intuito de avaliar os resultados dos testes serológicos nas amostras de soro e liquor, assim como os que existem para tentar encontrar uma técnica de PCR diagnóstica e de subtipagem que sejam eficazes em todas as fases da doença, esta última principalmente depois da sequenciação do genoma de *Treponema pallidum*.

O presente estudo teve como objectivo comparar os testes serológicos, não treponémicos e treponémicos, e avaliar as suas respectivas sensibilidades e especificidades nas amostras de soro, utilizando como teste padrão o teste FTA-Abs-G. Pretendeu ainda

otimizar a técnica de PCR diagnóstica, assim como a técnica de subtipagem ‘nested’ PCR-RFLP com o propósito de conhecer os subtipos de *Treponema pallidum* existentes.

Os testes serológicos analisados demonstram conduzir a resultados semelhantes e ter uma efectividade diagnóstica aceitável. No entanto, devido ao facto de não haver cultura para *Treponema pallidum*, de haver fases da doença sem sintomatologia e destes testes deixarem de ser reactivos após a terapêutica muitas vezes não se consegue efectuar um diagnóstico de certeza.

Por isso, uma outra abordagem possível para a análise dos resultados serológicos seria o seu tratamento considerando o modelo de classes latentes [17, 33]. Este modelo é, actualmente, utilizado com frequência na ausência de um teste de diagnóstico ‘gold standard’ [33, 38]. Uma das vantagens desta metodologia é que não tem associado o enviesamento resultante da comparação do teste escolhido como padrão, mas que não é de facto um ‘gold standard’, com os outros testes e que é um problema que surge no método de comparação com um teste padrão. Ainda assim, a utilização de um teste padrão foi o método adoptado por limitação temporal e por ser o mais conhecido e experimentado neste tipo de doenças não possuidoras de um teste de diagnóstico ‘gold standard’. No entanto, tais resultados poderão ser futuramente analisados utilizando o modelo de classes latentes, afigurando-se interessante uma eventual comparação dos resultados obtidos através dos dois modelos, apesar desta abordagem ser dificultada pelas fases assintomáticas da sífilis.

Em relação à técnica de PCR, o melhor resultado obtido foi com a técnica de PCR diagnóstica para o gene da lipoproteína de 47 kDa (*Tp47*).

No entanto, e tal como para outros microrganismos, a técnica de ‘real time’ PCR poderá ser uma mais-valia na detecção de *Treponema pallidum* pelo que será uma técnica a otimizar e experimentar em amostras clínicas num futuro próximo.

Também, como o anteriormente dito, a única amostra que se conseguiu subtipar deverá ser submetida a sequenciação para se verificar se corresponde a um subtipo em circulação.

Apesar da publicação do genoma de *Treponema pallidum* e de os estudos efectuados desde essa altura sobre a sua estrutura e biologia terem permitido a utilização de técnicas de biologia molecular, muito há ainda a fazer para que o diagnóstico desta doença seja efectuado rapidamente e com maior eficácia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Antunes, F. (2007).** Doenças Sexualmente Transmitidas. *In: Colectânea dos capítulos do manual sobre doenças infecciosas destinado ao apoio às aulas de infecciologia – Licenciatura de Microbiologia* (pp. 375-380). Publicação didáctica.
2. **Ballard, R., Htun, Y., Fehler, G., Neilsen, G. (2000).** Syphilis. *In: R. Ballard, Y. Htun, G. Fehler, G. Neilsen (Eds).* The diagnosis and management of sexually transmitted infections in Southern Africa (pp. 19-28), 3rd edition. Center for Sexually Transmitted Diseases. Johannesburg.
3. **Baughn, R.E., Musher, D.M. (2005).** Secondary syphilitic lesions. *Clinical Microbiology Reviews*. 18:205-216.
4. **Cameron, C.E. (2006).** The *T. pallidum* outer membrane and outer membrane proteins. *In: J.D. Radolf, S.A. Lukehart (Eds).* Pathogenic *Treponema*: Molecular and Cellular Biology (pp. 237-266). Caister Academic Press. England.
5. **Castro, R. (2004).** Contribuição para o estudo de infecção por *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*: resposta serológica, diagnóstico molecular e genotipagem. Dissertação de Doutoramento pela Universidade Nova de Lisboa.
6. **Castro, R., Prieto, E.S., Águas, M.J., Manata, M.J., Botas, J., Araújo, C., Borges, F., Aldir, I., Exposto, F.L. (2006).** Evaluation of the *Treponema pallidum* particle agglutination technique (TP.PA) in the diagnosis of neurosyphilis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 20:233-238.
7. **Castro, R., Prieto, E., Águas, M.J., Manata, M.J., Botas, J., Pereira, F.M. (2009).** Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Lisbon, Portugal. *Journal of Clinical Microbiology*. 47:2510-2512.
8. **Castro, R., Prieto, E., Águas, M.J., Manata, M.J., Botas, J., Santo, I., Azevedo, J., Pereira, F.L.H. (2007).** Detection of *Treponema pallidum* sp *pallidum* DNA in latent syphilis. *International Journal of STD & AIDS*. 18:842-845.
9. **Castro, R., Prieto, E.S., Pereira, F.L.M. (2008).** Nontreponemal tests in the diagnosis of neurosyphilis: an evaluation of the venereal diseases research laboratory (VDRL) and the rapid plasma reagin (RPR) tests. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 22:257-261.
10. **Castro, R., Prieto, E.S., Santo, I., Azevedo, J., Exposto, F.L. (2003).** Evaluation of an enzyme immunoassay technique for detection of antibodies against *Treponema pallidum*. *Journal of Clinical Microbiology*. 41:250-253.
11. **Castro, R., Prieto, E.S., Santo, I., Azevedo, J., Exposto, F.L. (2001).** Evaluation of the passive particle agglutination test in the serodiagnosis and follow-up of syphilis. *American Journal of Clinical Pathologists*. 116:581-585.
12. **Centurion-Lara, A. (2006).** Antigenic variation in *Treponema pallidum*. *In: J.D. Radolf, S.A. Lukehart (Eds).* Pathogenic *Treponema*: Molecular and Cellular Biology (pp. 267-284). Caister Academic Press. England.
13. **Centurion-Lara, A., Molini, B.J., Godornes, C., Sun, E., Hevner, K., Voorhis, W.C.V., Lukehart, S.A. (2006).** Molecular differentiation of *Treponema pallidum* subspecies. *Journal of Clinical Microbiology*. 44:3377-3380.
14. **Chan, D.J. (2005).** Syphilis and HIV co-infection: When is lumbar puncture indicated? *Current HIV Research*. 3:193-204.
15. **Cox, D.L., Radolf, J.D. (2006).** Metabolism of the *Treponema*. *In: J.D. Radolf, S.A. Lukehart (Eds).* Pathogenic *Treponema*: Molecular and Cellular Biology (pp. 61-100). Caister Academic Press. England.
16. **Cullen, P.A., Haake, D.A., Adler, B. (2004).** Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *Federation of European Microbiological Societies*. 1-28.
17. **Dendukuri, N., Hadgu, A., Wang, L. (2009).** Modeling conditional dependence between diagnostic tests: A multiple latent variable model. *Statistics in Medicine*. 28:441-461.

18. **Dyck, E.V., Meheus, A.Z., Piot, P. (1999).** Syphilis. In: E.V. Dyck, A.Z. Meheus, P. Piot (Eds.). Laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases (pp. 36-49). World Health Organization. Geneva.
19. **Florindo, C., Reigado, V., Gomes, J.P., Azevedo, J., Santo, I., Borrego M.J. (2008).** Molecular typing of *Treponema pallidum* clinical strains from Lisbon, Portugal. *Journal of Clinical Microbiology*. 46:3802-3803.
20. **Goh, B.T. (2005).** Syphilis in adults. *Sexually Transmitted Infections*. 81:448-452.
21. **Goh, B.T., Vader, P.C.v.V. (2001).** European guideline for the management of syphilis. In: K. Radcliffe (Ed.). European STD Guidelines, vol. 12 (pp. 14-26). International Journal of STD & AIDS.
22. **Gray, R.R., Mulligan, C.J., Molini, B.J., Sun, E.S., Giacani, L., Godornes, C., Kitchen, A., Lukehart, S.A., Centurion-Lara, A. (2006).** Molecular evolution of the *tpnC*, *D*, *I*, *K*, *G* and *J* genes in the pathogenic genus *Treponema*. *Molecular Biology and Evolution*. 23:2220-2233.
23. **Harper, K.N., Ocampo, P.S., Steiner, B.M., George, R.W., Silverman, M.S., Bolotin, S., Pillay, A., Saunders, N.J., Armelagos, G.J. (2008).** On the origin of the Treponematoses: a phylogenetic approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 1-13.
24. **Izard, J., Limberger, R.J. (2006).** Structural and genomic features of Treponemal Architecture. In: J.D. Radolf, S.A. Lukehart (Eds). Pathogenic *Treponema*: Molecular and Cellular Biology (pp. 39-59). Caister Academic Press. England.
25. **LaFond, R.E., Centurion-Lara, A., Godornes, C., Voorhis, W.C.V, Lukehart, S.A. (2006).** TprK sequence diversity accumulates during infection of rabbits with *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* Nichols strain. *Infection and Immunity*. 74:1896-1906.
26. **LaFond, R.E., Lukehart, S.A. (2006).** Biological basis for syphilis. *Clinical Microbiology Reviews*. 19:29-49.
27. **Larsen, S.A., Hambie, E.A. (1985).** Cerebrospinal fluid serologic test for syphilis: treponemal and nontreponemal tests. *Advances in Sexually Transmitted Diseases*. 157-162.
28. **Lewis, D.A., Young, H. (2006).** Syphilis. *Sexually Transmitted Infections*. 82:13-15.
29. **Liu, H., Rodes, B., Chen, C.Y., Steiner, B. (2001).** New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 39:1941-1946.
30. **Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2003).** Cell structure/function In: M.T. Madigan, J.M. Martinko, J. Parker (Eds). Brock Biology of Microorganisms (pp. 66-81), 10th edition. Pearson Education. Upper Saddle River, New Jersey.
31. **Marfin, A.A., Liu, H., Sutton, M.Y., Steiner, B., Pillay, A., Markowitz, L.E. (2001).** Amplification of the DNA polymerase I gene of *Treponema pallidum* from whole blood of persons with syphilis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 40:163-166.
32. **Marra, C.M., Tantaló, L.C., Maxwell, C.L., Dougherty, K., Wood, B. (2004).** Alternative cerebrospinal fluid tests to diagnose neurosyphilis in HIV-infected individuals. *Neurology*. 63:85-88.
33. **Menten, J., Boelaert, M., Lesaffre, E. (2008).** Bayesian latent class models with conditionally dependent diagnostic tests: A case study. *Statistics in Medicine*. 27:4469-4488.
34. **Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. (2006).** *Treponema, Borrelia e Leptospira*. In: P.R. Murray, K.S. Rosenthal, M.A. Pfaller (Eds). Microbiologia Médica (pp. 419-424), 5^a edição. Elsevier. Rio de Janeiro.
35. **Norris, S.J., Weinstock, G.M. (2006).** Comparative genomics of spirochetes. In: J.D. Radolf, S.A. Lukehart (Eds). Pathogenic *Treponema*: Molecular and Cellular Biology (pp. 19-38). Caister Academic Press. England.
36. **Orle, K.A., Gates, C.A., Martin, D.H., Body, B.A., Weiss, J.B. (1996).** Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and Herpes simplex virus types 1 and 2 from genital ulcers. *Journal of Clinical Microbiology*. 34:49-54.

37. Penn, C.W., Cockayne, A., Bailey, M.J. (1985). The outer membrane of *Treponema pallidum*: Biological significance and biochemical properties. *Journal of General Microbiology*. 131:2349-2357.
38. Pepe, M.S., Janes, H. (2007). Insights into latent class analysis of diagnostic test performance. *Biostatistics*. 8:474-484.
39. Pillay, A., Liu, H., Chen, C.Y., Holloway, B., Sturm, A.W., Steiner, B., Morse, S.A. (1998). Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. *Sexually Transmitted Diseases*. 8:408-414.
40. Pillay, A., Liu, H., Ebrahim, S., Chen, C.Y., Lai, W., Fehler, G., Ballard, R.C., Steiner, B., Sturm, A.W., Morse, S.A. (2002). Molecular typing of *Treponema pallidum* in South Africa: cross-sectional studies. *Journal of Clinical Microbiology*. 40:256-258.
41. Pope, V., Fox, K., Liu, H., Martin, A.A., Leone, P., Seña, A.C., Chapin, J., Fears, M.B., Markowitz, L. (2005). Molecular subtyping of *Treponema pallidum* from North and South Carolina. *Journal of Clinical Microbiology*. 43:3743-3746.
42. Radolf, J.D., Hazlett, K.R.O., Lukehart, S.A. (2006). Pathogenesis of syphilis. In: J.D. Radolf, S.A. Lukehart (Eds). *Pathogenic Treponema: Molecular and Cellular Biology* (pp. 197-236). Caister Academic Press. England.
43. Radolf, J.D., Lukehart, S.A. (2006). Immunology of syphilis. In: J.D. Radolf, S.A. Lukehart (Eds). *Pathogenic Treponema: Molecular and Cellular Biology* (pp. 285-322). Caister Academic Press. England.
44. Radolf, J.D., Moomaw, C., Slaughter, C.A., Norgard, M.V. (1989). Penicillin-binding proteins and peptidoglycan of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *Infection and Immunity*. 57:1248-1254.
45. Radolf, J.D., Robinson, E.J., Bourell, K.W., Akins, D.R., Porcella, S.F., Weigel, L.M., Jones, J.D., Norgard, M.V. (1995). Characterization of outer membranes isolated from *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Infection and Immunity*. 63:4244-4252.
46. Radolf, J.D., Steiner, B., Shevchenko, D. (1999). *Treponema pallidum*: doing a remarkable job with what it's got. *Trends in Microbiology*. 7:7-9.
47. Ratnam, S. (2005). The laboratory diagnosis of syphilis. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*. 16:45-51.
48. Rodrigo, F.G., Silva, A.M. (2003). Sífilis. In: F.G. Rodrigo, A.M. Silva (Eds). *Doenças Transmitidas Sexualmente: Dermatologia e Venereologia* (pp. 45-70). LIDEL, Lisboa.
49. Šmajš, D., Matějková, P., Woznicová, V., Vališová Z. (2006). Diagnosis of syphilis by polymerase chain reaction and molecular typing of *Treponema pallidum*. *Medical Microbiology*. 17:93-99.
50. Sutton, M.Y., Liu, H., Steiner, B., Pillay, A., Mickey, T., Finelli, L., Morse, S., Markowitz, L.E., Louis, M.E.St. (2001). Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in an Arizona County with increasing syphilis morbidity: Use of specimens from ulcers and blood. *The Journal of Infectious Diseases*. 183:1601-1606.
51. Swancutt, M.A., Radolf, J.D., Norgard, M.V. (1989). The 34-kilodalton membrane immunogen of *Treponema pallidum* is a lipoprotein. *Infection and Immunity*. 58:384-392.
52. Wyngaarden, J.B., Smith, L.H. (1984). Sífilis. In: J.B. Wyngaarden, L.H. Smith (Eds). *Cecil Tratado de Medicina Interna*, vol. II (pp. 1598-1608), 16ª edição. Interamericana. Rio de Janeiro.
53. Yelton, D.B., Limberger, R.J., Curci, K., Malinosky-Rummell, F., Slivienski, L., Schouls, L.M., van Embden, J.D.A., Charon, N.W. (1991). *Treponema phagedenis* encodes and expresses homologs of the *Treponema pallidum* TmpA and TmpB proteins. *Infection and Immunity*. 59:3685-3693.
54. Zetola, N.M., Engelman, J., Jensen, T.P., Klausner, J.D. (2007). Syphilis in the United States: An update for clinicians with an emphasis on HIV coinfection. *Mayo Clinic Proceedings*. 82(9):1091-1102.

6. ANEXOS

Tabela Suplementar 1. ‘Primers’ utilizados nas reacções de PCR.

Gene alvo	‘Primer’	Sequência (5’→ 3’)	Dimensão do produto (bp)	Referência
<i>tp47</i>	KO3A-F	AAGTTTGTCCCAGTTGCGGTT	260	[36]
	KO4-R	AGAGCCATCAGCCCTTTTCA		
<i>polA</i>	polA-F	AAGTTTGTCCCAGTTGCGGTT	378	[29]
	polA-R	CACAGTGCTCAAAAACGCGTGACACG		
<i>trp</i>	B1-F	ACTGGCTCTGCCACACTTGA	2186	[39]
	A2-R	CTACCAGGAGAGGGTGACGC		
	IP6-F	CAGGTTTTGCCGTTAAGC	1836	
	IP7-R	AATCAAGGGAGAATACCGTC		

Tabela Suplementar 2. Reacções de PCR (33) realizadas para optimização da técnica de PCR diagnóstica Multiplex.

Técnica de PCR Diagnóstica Multiplex				
[KO3A-F/KO4-R] (μM)	[polA-F/polA-R] (μM)	[MgCl ₂] (mM)	Vol. DNA (μl)	T. ‘annealing’ (°C)
0,5	0,5	1,5	2,5	58 / 60 / 62
		2		
		3		
		3,5		
		4		
0,2	0,2	2,5	2,5	62
0,3	0,3			
0,4	0,4			
0,5	0,5			
0,6	0,6			
0,2	0,2	2,5	2,5	62
			5	
			7	
			10	
0,1	0,2	2,5	5	62
0,2				
0,3				
0,4				
0,5				
0,2	0,1	2,5	5	62
	0,3			
	0,4			
	0,5			

Tabela Suplementar 3. Reacções de PCR (29) realizadas para optimização da técnica de subtipagem por 'Nested'- PCR.

Técnica de Subtipagem por 'Nested' PCR - PCR 'Outer'			
[B1-F/A2-R] (μ M)	[MgCl ₂] (mM)	Vol. DNA (μ l)	T. 'annealing' (°C)
0,2	3	1 / 2,5	59
0,4			
0,6			
0,6	2	2,5	59
	2,5		
	3		
	3,5		
0,6	3	5	59

Técnica de Subtipagem por 'Nested' PCR - PCR 'Inner'			
[IP6-F/IP7-R] (μ M)	[MgCl ₂] (mM)	Vol. produto PCR 'Outer' (μ l)	T. 'annealing' (°C)
0,2	3	0,5	60 / 62
0,4			
0,6			
0,2	2 / 2,5 / 3	0,5	62
0,4			
0,6			
0,2	3	2,5	62
0,4			
0,2	3	1	62

Tabela Suplementar 4. Reacções (5) realizadas para optimização da técnica de RFLP.

Técnica de RFLP			
Vol. tampão 10X (μ l)	Mse I (U)	Vol. produto PCR 'Inner' (μ l)	Temperatura / Período de incubação
1,5	2,5	6	37°C 'overnight'
2,49	4,15	10	37°C 'overnight' / 37°C 4 h
1,5	2,5	5	37°C 'overnight' / 37°C 4 h